

Aus dem Institut für Biochemie
(Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Paul Saftig)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

PRÄKLINISCHE STUDIEN ZUR ENZYMERSATZTHERAPIE
BEI ALPHA-MANNOSIDOSE

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

MEIKE LÜDEMANN
aus Kaltenkirchen

Kiel 2012

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Saftig, Biochemisches Institut
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bleich, Physiologisches Institut
Tag der mündlichen Prüfung:	13.06.2013
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	13.06.2013
gez.	Prof. Dr. Edmund Maser (Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Lysosomen	1
1.2.	Lysosomale Speichererkrankungen (LSD)	4
1.3.	α -Mannosidose (OMIM-Nr.: 248500)	12
1.4.	Bluthirnschranke	16
1.5.	Fragestellung	18
2.	Material und Methoden	19
2.1.	Material	19
2.1.1	Chemikalien, Geräte, Materialien	19
2.1.2	Antikörper	19
2.1.3	Mausstämme	20
2.1.4	Zelllinien	21
2.1.5	Substitutionsenzym	21
2.2.	Methoden	22
2.2.1	Zellbiologische Methoden	22
2.2.2	Biochemische Methoden	25
2.2.3	Mikroskopische Methoden	31
3.	Ergebnisse	32
3.1.	Zeitpunkt der Reakkumulation nach Reduktion der lysosomalen Ablagerungen nach Enzyersatztherapie (ERT)	32
3.1.1	Enzymaktivitäten der α -Mannosidase nach ERT	32
3.1.2	Beurteilung der Oligosaccharidablagerungen nach ERT	34
3.1.3	Histologische Analyse des ZNS und PNS nach ERT	37
3.1.4	Immunreaktion nach Applikation von 4 x 500 mU/mg KG rhLAMAN	40
3.2.	Enzymsubstitution über 112 Tage – Langzeitexperiment	41
3.2.1	Immunologische Auswertung des Langzeitexperiments	42
3.2.2	Biochemische Auswertung des Langzeitexperiments	43
3.3.	Altersabhängige Enzymaufnahme ins Gehirn	45
3.3.1	Nachweis der α -Mannosidaseaktivität nach ERT	46
3.3.2	Nachweis von rhLAMAN und LAMP1 in Geweben nach ERT	47
3.3.3	Nachweis der Oligosaccharidablagerungen nach ERT	50

3.4.	Endozytotische Aufnahme von rhLAMAN in vitro	51
3.4.1	Aufnahme und Blockade der Aufnahme von rhLAMAN in unterschiedlichen Zelltypen	52
3.4.2	Aufnahme und Blockade der Aufnahme von rhLAMAN in MPR-defizienten Zellen.....	53
3.4.3	Aufnahme von rhLAMAN in unterschiedlichen Dosen in MPR46/300_KO-Zellen.....	55
3.5.	Analyse von Gehirnen adulter WT- und KO- Mäusen in zwei unterschiedlichen Altersstufen	58
3.5.1	Analyse von Gehirnen von WT- und KO-Mäusen unterschiedlichen Alters mittels Immunfluoreszenzmikroskopie.....	58
3.5.2	Westernblotanalysen von Gehirnen von WT- und KO-Mäusen unterschiedlichen Alters.....	62
4.	Diskussion	65
4.1.	Enzymaufnahme ins Gehirn	66
4.1.1	Überwinden der Bluthirnschranke früh-postnatal und nach Modifizierung des Protokolls der Enzyersatztherapie möglich	66
4.1.2	Mannose-6-Phosphat unabhängige Enzymaufnahme	71
4.2.	Morphologie der Gehirne von α-Mannosidase KO-Mäusen.....	74
4.3.	Therapiemodell.....	76
5.	Zusammenfassung	79
6.	Literaturverzeichnis	81
7.	Anhang	94
7.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	94
7.2.	Verwendete Chemikalien.....	96
7.3.	Verwendete Geräte.....	98
7.4.	Verwendete Materialien	99
7.5.	Verwendete Rezepte	100
7.6.	Tierschutzgenehmigung	102
8.	Danksagung	104
9.	Veröffentlichungen	105
10.	Lebenslauf	106

1. Einleitung

1.1. Lysosomen

Lysosomen sind membranumhüllte, saure, enzymreiche Zellorganellen, die mit Ausnahme der Erythrozyten im Zytoplasma aller menschlichen Körperzellen vorkommen. Sie wurden 1955 das erste Mal von De Duve beschrieben (De Duve u.a., 1955). Charakteristisch für Lysosomen ist ein intravesikulärer pH-Wert von pH 4,5 bis 5, sowie das Vorkommen von speziellen lysosomalen Enzymen. Es werden zwei Arten an lysosomalen Proteinen unterschieden, zum Einen sind etwa 50 saure Hydrolasen in löslicher Form bekannt, zum Anderen sind diverse integrale lysosomale Membranproteine (LMP'S) wie beispielsweise LAMP1, LAMP2 und LIMP2 beschrieben (Saftig & Klumperman, 2009; Winchester, 2001). Das saure Milieu im Lysosom wird von einer membranständigen Protonenpumpe (H^+ -ATPase vom V-Typ) kontinuierlich generiert und bildet die Voraussetzung für die optimale Enzymaktivität der Hydrolasen (Mancini u. a., 2000).

Die Hauptaufgabe der Lysosomen besteht darin, zelleigenes und zellfremdes Material enzymatisch abzubauen und die entstandenen Grundbausteine der Zelle für erneute Syntheseprozesse zur Verfügung zu stellen. Zu degradierendes Material gelangt abhängig von der Art und der Lokalisation auf unterschiedlichen Wegen in die Lysosomen. Zelleigenes Material erreicht die Lysosomen via Autophagozytose. Hierbei umschließen Intrazellulärmembranen zytoplasmatische Makromoleküle unbekannten Ursprungs, die aufgrund von Fehlern in Funktion oder Aufbau oder im Rahmen physiologischer Abbauprozesse degradiert werden sollen (Hunziker & Geuze, 1996; Mortimore u. a., 1996). Zellfremdes, extrazelluläres Material gelangt in Form von unspezifischer Endozytose als Phagozytose bzw. Pinozytose oder mittels ligandenspezifischer rezeptorvermittelter Endozytose in die Zelle. Bei diesem Prozess bilden sich nach Einstülpung der Plasmamembran von ihr umhüllte, mit Clathrin bedeckte Vesikel, die in den Intrazellulärraum aufgenommen werden (Luzio u. a., 2003; Lloyd, 1996; Goldstein u. a., 1985). Diese mit abzubauenen Makromolekülen angereicherten Phagosomen bzw. Endosomen fusionieren mit primären Lysosomen zu degradativen Lysosomen, in denen der weitere Abbau und Verdau mittels Proteasen, Lipidasen und Glykosidasen stattfindet (Kornfeld & Mellman, 1989). Neben dem Abbau von Makromolekülen spielen lysosomale Hydrolasen

zudem eine Rolle bei der Initiation des programmierten Zelltods (Apoptose), der Prozessierung von Antigenen, dem Abbau von Extrazellulärmatrix, sowie der Reparatur von Zellmembrandefekten (Conus & Simon, 2008; Reddy u. a., 2001).

Die lysosomalen Enzyme selbst werden im rauen endoplasmatischen Retikulum als inaktive Vorstufen synthetisiert. Nach Erreichen des Golgi-Apparates folgt die spezifische Anheftung eines Mannose-6-Phosphat Restes durch eine Phosphotransferase und eine Diesterase (Reitman & Kornfeld, 1981; Varki & Kornfeld, 1981; Waheed u. a., 1981) (Abb. 1.1).

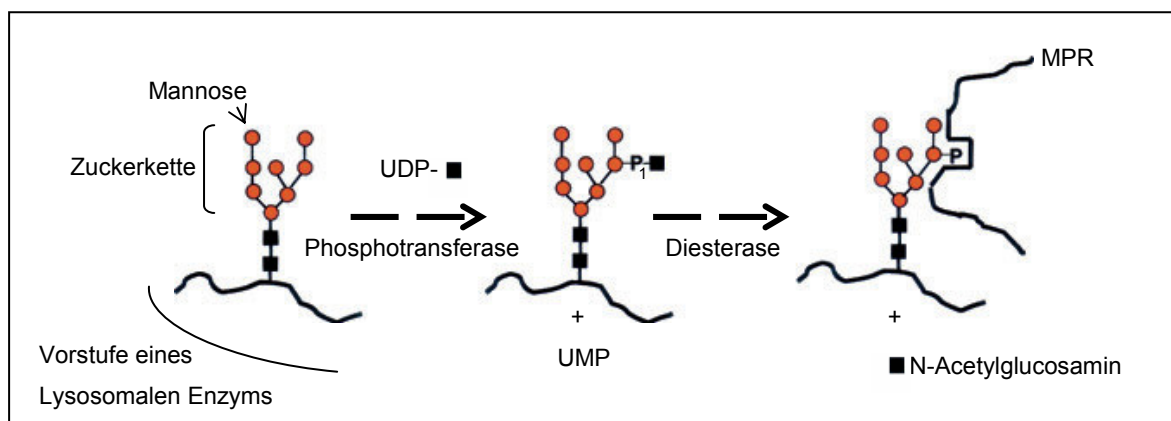


Abb. 1.1: Anheftung des für lysosomale Enzyme spezifischen Liganden Mannose-6-Phosphat (modifiziert nach Vellodi, 2005).

Durch diesen entscheidenden Schritt werden die Glykoproteine für den Pfad in die lysosomalen Kompartimente markiert, da diese so im trans-Golgi Netzwerk (TGN) von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPRs) spezifisch erkannt und gebunden werden (Braulke & Bonifacio, 2009; von Figura & Hasilik, 1986). Hierbei binden 46 kDa große, Kation-abhängige Rezeptoren (MPR46) mit höherer Affinität lysosomale Enzyme mit einem Phosphomonoester und 300 kDa große, Kation-unabhängige Rezeptoren (MPR300) bevorzugt solche mit zwei Phosphomonoestern (Munier-Lehmann u. a., 1996). Nach Bindung am MPR kommt es im direkten Anschluss zur Abschnürung von Vesikeln, die den Komplex aus MPR und lysosomaler Hydrolase beinhalten und weiter zu den Lysosomen transportiert werden. Auf dem Weg dahin findet eine Fusion mit Endosomen statt, wodurch sich der intravesikuläre pH-Wert reduziert, was wiederum die Auflösung des Liganden-Rezeptorkomplexes zur Folge hat (Gonzalez-Noriega u. a., 1980). Im Anschluss wird der MPR weiter verwertet und hierfür zurück an das TGN (MPR46 und MPR300) oder die Plasmamembran (MPR300) befördert, wodurch die endozytotische

Aufnahme extrazellulärer Hydrolasen möglich ist (Ghosh u. a., 2003) (Abb. 1.2). Die lysosomalen Enzyme gelangen weiter zu den Lysosomen und werden dort durch weitere Schritte wie Proteolyse, Faltung und Lagerung zu reifen, aktiven Enzymen aufbereitet (Brown u. a., 1986). Einige lösliche lysosomale Enzyme und nicht-enzymatische Proteine werden MPR-unabhängig mittels anderer Rezeptoren wie dem lysosomalen integralen Membranprotein LIMP2 und Sortilin zum Lysosom transportiert (Braulke & Bonifacino, 2009; Saftig & Klumperman, 2009). Zudem bindet ein variabler Anteil von neu synthetisierten lysosomalen Enzymen nicht an den MPR, sondern wird sezerniert.

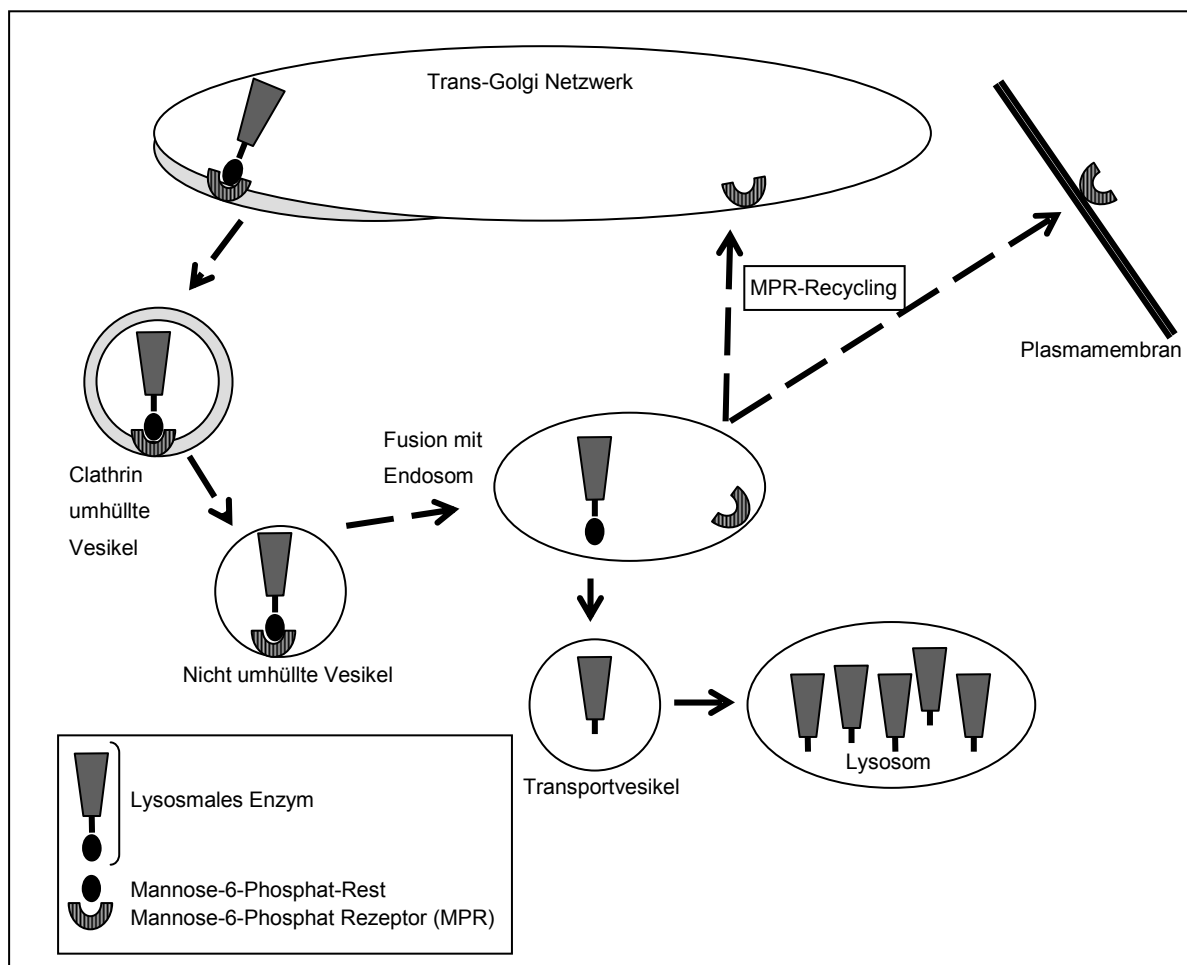


Abb. 1.2: Kreislauf der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR). MPRs binden die mit M6P-Rest bestückten lysosomalen Enzyme an deren Syntheseort, dem trans-Golgi Netzwerk (TGN). Auf dem Weg zum Lysosom fusionieren die hiervon abgeschnürten Vesikel mit Endosomen, was aufgrund von pH-Veränderungen ins saurere Milieu die Dissoziation des Rezeptor-Liganden-Komplexes zur Folge hat. Anschließend werden die lysosomalen Enzyme zum Lysosom weitertransportiert und sowohl auf dem Weg dorthin als auch im Lysosom selbst weiterprozessiert. Die MPRs werden weiter verwertet und hierfür entweder zurück zum TGN oder zur Plasmamembran transportiert.

1.2. Lysosomale Speichererkrankungen (LSD)

Lysosomale Speichererkrankungen (LSD) sind seltene Erkrankungen, die zu den genetisch bedingten Stoffwechselerkrankungen zählen. Die Prävalenz unter Lebendgeborenen variiert von 1:5700 für Morbus Gaucher bis zu 1:4,2 Millionen für Sialidose, zusammengefasst beträgt die Erkrankungshäufigkeit aller Lysosomalen Speichererkrankungen gemeinsam 1:7700 (Meikle u. a., 1999). Bisher sind etwa 50 verschiedene Lysosomale Speichererkrankungen beschrieben. Bis auf drei Ausnahmen werden diese autosomal rezessiv vererbt. Morbus Fabry, Morbus Hunter (MPS II) und Morbus Danon folgen einem X-gonosomal rezessiven Erbgang (Mehta u. a., 2006; Masson u. a., 2004; Sugie u. a., 2003). Typische Merkmale Lysosomaler Speichererkrankungen sind das meist frühe Auftreten erster Krankheitssymptome im Säuglings- bzw. Kindesalter sowie eine häufige zentralnervöse Manifestation. Ist das Zentralnervensystem (ZNS) von der Krankheit betroffen, gelten die Patienten bisher als nicht kurativ behandelbar. Bestehende Therapieoptionen, die die Bluthirnschranke überwinden und somit das ZNS erreichen, sind zwar in der Lage das Fortschreiten der Krankheit zu verlangsamen oder zu verhindern, können die bestehenden Defekte und Funktionsverluste jedoch maximal geringgradig aufheben (Jeyakumar u. a., 2005). Deshalb ist ein entsprechend frühzeitiger Therapiebeginn anzustreben, was wiederum eine frühzeitige Diagnosestellung dieser seltenen Krankheiten im Rahmen von Neugeborenen Screenings voraussetzen würde (Nakamura u. a., 2011; Hwu u. a., 2010; Matern, 2008; Meikle u. a., 2004).

Insgesamt zeigen die Lysosomalen Speichererkrankungen eine weite phänotypische Variationsbreite, wobei selbst einzelne Krankheiten inhomogene klinische Manifestationen und unterschiedliche symptomatische Intensitäten aufweisen. Dieser Umstand ist ätiologisch begründet. Die Lysosomalen Speichererkrankungen beruhen auf einem Defekt innerhalb der Lysosomen, wobei dieser hauptsächlich durch Mutationen in Genen zustande kommt, welche für lysosomale Enzyme kodieren (Vellodi, 2005). Außerdem sind die Abwesenheit von Aktivatorproteinen, Fehlfunktionen von lysosomalen Transportern, Defekte von lysosomalen Membranproteinen, sowie multiple Enzymdefizienzen als Krankheitsursache beschrieben (Beck, 2007). Durch die Genmutationen in lysosomalen Enzymen kommt es zur Reduktion in Aktivität und Funktion oder zum gänzlichen Fehlen von jeweils einzelnen lysosomalen Hydrolasen. Dies hat zur Folge, dass die entsprechenden

Substrate nicht ausreichend bzw. gar nicht abgebaut werden und es zur Ablagerung des nicht degradierten Materials in den Lysosomen und in den Zellen kommt (Wraith, 2002). Morphologisches Korrelat dieser Akkumulation ist das Vorhandensein von licht- und elektronenmikroskopisch sichtbaren Speichervakuolen in den Zellen (beispielhafte Darstellung dieser anhand der LSD α -Mannosidose in Abb. 1.3) sowie die Größenzunahme der Zellen und der Zellverbände und Gewebe (Vellodi, 2005).

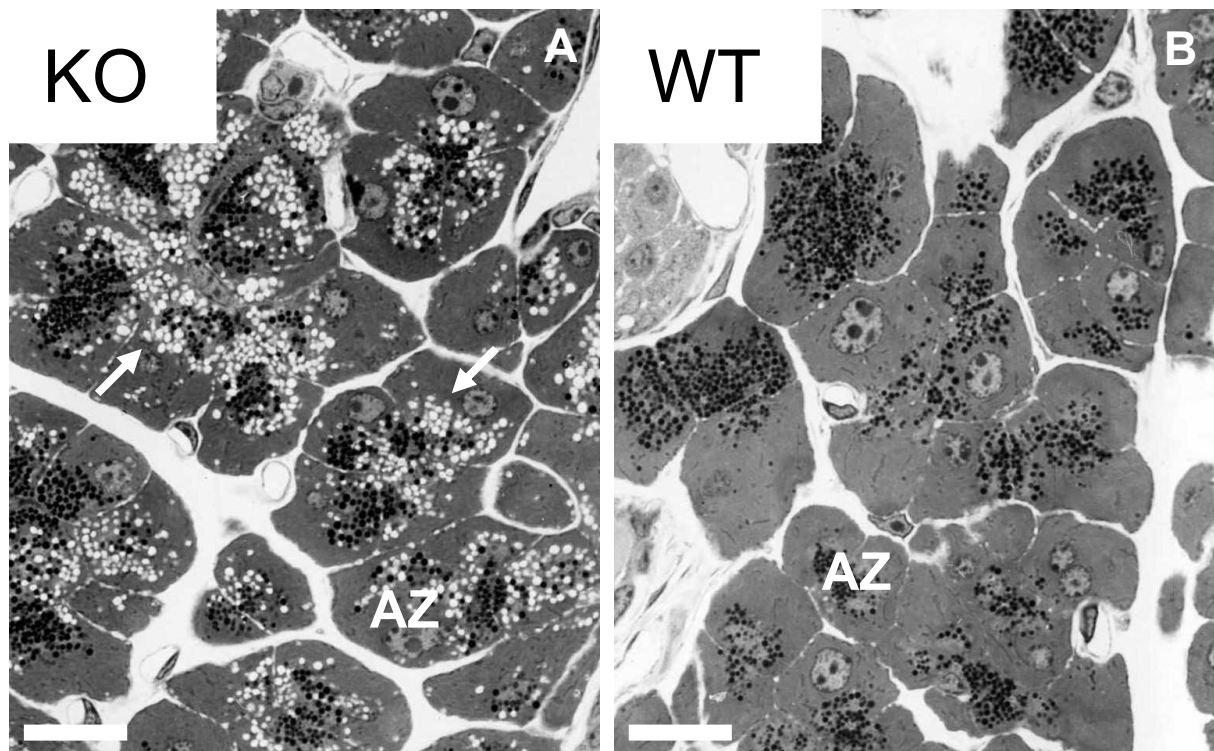


Abb. 1.3: Krankheitstypische Speichervakuolen im Rahmen der Lysosomalen Speichererkrankungen am Beispiel der α -Mannosidose. Die Speichervakuolen erscheinen leer, da das abgelagerte Material im Rahmen der Aufarbeitung der Schnitte herausgelöst wird. Hier abgebildet ist eine lichtmikroskopische Aufnahme der Azinuszellen (AZ) des Pankreas einer an α -Mannosidose erkrankten, unbehandelten Maus (KO) (A), die diversen Speichervakuolen (Pfeile) darstellt, sowie eine vergleichbare Aufnahme einer gesunden Maus (WT) (B), die die physiologische Morphologie der Azinuszellen des Pankreas zeigt. Maßeinheit 50 μ m. Semidünnschnitt (1 μ m), Toluidinblau, Aufnahmen R. Lüllmann-Rauch, R. Coenen, Anatomisches Institut Kiel.

Angefüllte Lysosomen beeinträchtigen die Funktionsfähigkeit der einzelnen Zelle und gestörte Zellen wiederum beeinträchtigen die Funktionsweise von Gewebe und letztlich von Organen und Organsystemen. Die genauen Abläufe, wie Speicher-material die Zelle funktional behindert und dies dann zur Ausbildung der krankheitsspezifischen Symptomkomplexe führt, sind bis heute nicht gänzlich verstanden. Eine Rolle könnten Veränderungen des intrazellulären Calciums und seines intrazellulären Stoffwechsels, Beeinträchtigungen von Autophagozytose-abläufen, Aktivierungen von Signaltransduktionswegen durch Substrate, die dies in

nicht physiologischer Weise tun, Entzündungen und andere Faktoren spielen (Ballabio & Gieselmann, 2009).

Die klinische Varianz und Heterogenität der Krankheitsbilder ist neben der Art des Speichermaterials zusätzlich durch die Art und Lokalisation der betroffenen Zellen und Gewebe begründet. Weitere Faktoren bezüglich der klinischen Manifestation sind zudem der genetische Hintergrund, Umwelteinflüsse und die Tatsache, ob es sich um eine mosaikartige Insuffizienz oder eine wahre Defizienz handelt. In Abhängigkeit dieser Einflüsse kann das Einsetzen der Erkrankung sowie deren Verlauf und Fortschreiten und damit deren Schweregrad stark variieren und gleiche Genmutationen können zu Manifestationen im Säuglings-, Kindes- oder Erwachsenenalter führen, unterschiedliche Organe beeinträchtigen und verschiedene Symptomintensitäten aufweisen (Futerman & van Meer, 2004; Rapola, 1994). Trotz dieser deutlichen Heterogenität innerhalb der Lysosomalen Speichererkrankungen präsentieren sich einige der wichtigsten Phänotypen in einem Symptomkontinuum. So zeigen Patienten vieler Erkrankungen eine abnorme Vergrößerung von Milz und Leber (Hepatosplenomegalie), Knochendeformationen (Dysostosis multiplex), Herz- und Nierenschäden sowie ein abgeschwächtes Immunsystem (Malm & Nilssen, 2008; Castaneda u. a., 2008). Zudem ist die Mehrheit der Speichererkrankungen zusätzlich durch Beteiligung des cerebralen Gewebes geprägt, welche wiederum einhergeht mit Entwicklungsverzögerungen, geistiger Retardierung und einer gesteigerten Anfallsneigung (Wilcox, 2004).

In Abhängigkeit von der biochemischen Zusammensetzung des Speichermaterials, klinischen Aspekten und der Pathogenese können die Lysosomalen Speichererkrankungen in verschiedene Gruppen aufgeteilt werden (s. Tabelle 1.1, modifiziert nach Roces, 2005; Jeyakumar u. a., 2005).

Tabelle 1.1: Lysosomale Speichererkrankungen (nicht alle aufgelistet)		
Name der Krankheit	Proteindefekt/ defizienz	Lokalisation
1. Defekte im Zuckerabbau		
1.1 Glycosaminoglykanabbau (Mukopolysaccharidosen)		
MPS I (Hurler/ Scheie)	α -Iduronidase	4p16.3
MPS II (Hunter)	Iduronate sulfatase	Xq28
MPS IIIA (Sanfilippo A)	Heparan N-sulfatase	17q25.3
MPS IIIB (Sanfilippo B)	N-Acetylglucosaminidase	17q21
MPS IIIC (Sanfilippo C)	Acetyl-CoA transferase	8p11.1
MPS IIID (Sanfilippo D)	N-Acetylglucosamin-6-sulfatase	12q14
MPS IVA (Morquio A)	N-Acetylgalactosamin-6-sulfatase	16q24.3
MPS IVB (Morquio B)	β -Galactosidase	3p21.33
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	N-Acetylgalactosamin-4-sulfatase	5q11-13
MPS VII (Sly)	β -Glucuronidase	7q21.11
1.2 Glykoproteinabbau (Oligosaccharidosen)		
α -Mannosidose	α -Mannosidase	19p13.2-q12
β -Mannosidose	β -Mannosidase	4q22
Sialidose (Mukopolidose I)	α -Sialidase	6p21.3
Fucosidose	α -Fucosidase	1q34
1.3 Glykolipidabbau		
GM1- Gangliosidose (MPS IVB)	β -Galactosidase	3p21.33
GM2- Gangliosidose (Tay-Sachs)	β -Hexosaminidase, α -subunit	15q23
GM2- Gangliosidose (Sandhoff)	β -Hexosaminidase, β -subunit	5q13
GM2- Gangliosidose	GM2 Aktivator Protein	5q31
M. Gaucher	Glucocerebrosidase	1q21
	Saposin C	10q22.1
M. Fabry	α -Galactosidase A	Xq22.1
Metachromatische Leukodystrophie	Arylsulfatase A	2q13.31
	Saposin B	10q22.1
M. Krabbe	β -Galactosylceramidase	14q31

1.3 Glykogenabbau		
M. Pompe	α -Glucosidase	17q25
<u>2. Defekte im Lipidabbau</u>		
M. Niemann Pick A und B	saure Sphingomyelinase	11p15.2
M. Faber	saure Ceramidase	8q22
<u>3. Defekte im Proteinabbau</u>		
Pycnodystostose	Cathepsin K	1q26
Ceroide Lipofuscinose 1	Palmitoyl-Protein-Thioesterase	1p32
Ceroide Lipofuscinose 2	Tripeptidyl-Peptidase	11q15.5
<u>4. Defekte lysosomaler Transporter</u>		
Cystinose	Cystinosin (Cystintransport)	17p13
M. Salla	Sialin (Sialinsäuretransport)	6q14
<u>5. Defekte lysosomaler Transportwege/ von Transmembranproteinen (Auszug)</u>		
Mucopolysaccharidose II (I-Zell-Erkrankung)	N-Acetylglucosamin- phosphoryl-transferase	12q23.3
M. Danon	LAMP2	Xq24
M. Niemann Pick C	NPC1 und NPC2	11q11-12

Derzeit stehen für einige Lysosomale Speichererkrankungen Therapieoptionen zur Verfügung. Zugelassen für einzelne Krankheiten sind als Maßnahmen Knochmark-/ Stammzelltransplantation, Enzyersatztherapie (ERT) und Substratreduktionstherapie (SRT) (Beck, 2010). Gemeinsames Ziel aller Therapieansätze ist die Reduktion des akkumulierten Speichermaterials, so dass eine Stagnation des Krankheitsprozesses oder sogar eine Remission induziert wird.

Die erste Knochenmarktransplantation bei einer Lysosomalen Speichererkrankung, der Mukopolysaccharidose Typ I-H (Morbus Hurler), wurde von Hobbs 1981 beschrieben (Hobbs u. a., 1981). Bei der Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen werden die Stammzellen des Patienten durch die eines Spenders ersetzt. Die Stammzellen des Spenders sind in der Lage eine ausreichende Menge an fehlendem Enzym zu bilden, um die vorbestehende, krankheitstypisch verminderte oder fehlende Enzymaktivität auszugleichen. Bis heute wurde bei einigen Krankheiten dieser Gruppe eine solche Stammzelltransplantation durchgeführt, dazu gehören unter anderem MPS I-H, MPS II, MPS III, MPS VII,

Aspartylglucosaminurie, Fucosidose, α -Mannosidose, Morbus Faber, Morbus Gaucher (II/ III), Metachromatische Leukodystrophie, Morbus Niemann-Pick A/ B, Morbus Krabbe, Morbus Wolman, MLS II (Krivit, 2004).

Da diverse Faktoren wie die Pathogenese der zu behandelnden Krankheit, das klinische Bild und die Schwere der Krankheit im Allgemeinen zum Zeitpunkt der Transplantation, das Vorliegen der Mitbeteiligung zentralnervöser Strukturen und dessen Ausprägung innerhalb des Krankheitskomplexes, das Alter des Patienten und seine allgemeine körperlich und immunologische Konstitution Einfluss auf den Therapieerfolg nehmen, wurden mit der Stammzelltransplantation in den einzelnen Krankheiten sehr unterschiedliche Resultate erzielt (Cartier & Aubourg, 2008; Peters & Steward, 2003). Zusätzlich ist zu beachten, dass ein Mortalitätsrisiko von etwa 10 % mit dieser Therapie assoziiert ist (Mehta u. a., 2006). Um die Effektivität dieser Therapieform gerade in der Gruppe der Lysosomalen Speichererkrankungen mit ZNS-Beteiligung zu steigern wird derzeit an einem weiteren Prozedere als Ergänzungstherapie geforscht. In präklinischen Studien werden hierbei viral gentransferierte Vektoren Kleintieren direkt intrakranial appliziert. Dies habe eine Reduktion des lysosomalen Speichermaterials im Gehirn und eine funktionelle cerebrale Verbesserung zur Folge (Sands & Haskins, 2008).

Neben der Stammzelltransplantation stehen für manche Krankheiten Enzymersatztherapie und Substratreduktionstherapie zur Verfügung. Wie der Name es bereits impliziert, wird bei der Enzymersatztherapie das fehlende Enzym mittels intravenöser Infusionen substituiert. Grundlage dieser Therapieform ist die Feststellung, dass der Enzymdefekt kultivierter, dermalen Fibroblasten von Mucopolysaccharidose Patienten korrigierbar ist, wenn diese mit anderen oder normalen defektfreien Zellen gelagert werden (Fratantoni u. a., 1968). Erklärt wird diese Erkenntnis dadurch, dass die defektfreien Zellen das fehlende lysosomale Enzym der Zellen mit Enzymdefekt in geringen Maßen sezernieren und dieses dann von den defizienten Nachbarzellen vor allem durch plasmamembranständige MPRs gebunden und mittels MPR-abhängiger Endozytose aufgenommen wird (Pohlmann u. a., 1983). Im Anschluss wird das Enzym weiter zu dessen Erfolgsorganellen, den Lysosomen, transportiert und steigert dort die bestehende Aktivität, was wiederum den Abbau des vorhandenen Speichermaterials zur Folge hat. Es wurde beobachtet, dass lediglich ein Anstieg der Enzymaktivität von 1 bis 5 % erforderlich ist, um eine solche Entspeicherung herbeizuführen (O'Brien u. a., 1973; Porter u. a., 1971).

Für die Enzyersatztherapie wurden zunächst Enzyme genutzt, die aus Zellen menschlicher Plazentas gewonnen wurden. Heute werden zu substituierende Enzyme als rekombinante Enzyme mit Hilfe gentechnischer Methoden vor allem in CHO Zellen (Chinesische Hamster Ovarien) produziert, vor Gebrauch gereinigt und aufbereitet. Aufgrund der rezeptorvermittelten Internalisation von extrazellulärem Enzym kommt die Enzyersatztherapie entsprechend nur für Lysosomale Speichererkrankungen in Betracht, deren Ursachen in der Defizienz von löslichen Hydrolasen liegen, die in physiologischer Weise Liganden von Plasmamembranrezeptoren sind. Eine zusätzliche Limitierung in Bezug auf ihren Anwendungsbereich erfährt die Enzyersatztherapie dadurch, dass deren applizierte Enzyme bisher nur in geringem Maße ins ZNS eindringen (Begley u. a., 2008). Aktuelle Studien haben jedoch gezeigt, dass durch unterschiedliche Variationen und Manipulationen der Enzyersatztherapie lysosomale Enzyme die Bluthirnschranke überqueren und Ablagerungen von Speichermaterial im ZNS reduzieren können (s. 4.).

Dennoch profitieren derzeit nur Patienten von einer Enzyersatztherapie, deren Krankheit auf die peripheren Gewebe beschränkt ist. Bis heute steht für folgende sechs Lysosomale Speichererkrankungen eine Enzyersatztherapie zur Verfügung: Morbus Gaucher Typ I, Morbus Fabry, MPS I, MPS II, MPS VI, Morbus Pompe (Brady, 2006) (Tabelle 1.2). Die Substitutionspräparate werden in unterschiedlichen Zeitintervallen den Patienten intravenös mittels mehrstündigen Infusionen appliziert. Die Therapie muss lebenslang durchgeführt werden und erzeugt sehr hohe Kosten. Am erfolgreichsten ist die Enzyersatztherapie bei der nicht-neuropathischen Form des Morbus Gaucher, dem Typ I. Aufgrund des guten Sicherheits- und Effektivitätsprofils wird diese Therapie hier als Goldstandard angesehen (Weinreb, 2008).

Durch die Gabe von Fremdeiweiß in Form des substituierten Enzyms kommt es regelrecht zu Immunreaktionen in Form von Antikörperbildung (vor allem IgG) gegen das applizierte Enzym. Patienten mit Mucopolysaccharidosen litten hierdurch nicht unter nachteiligen Konsequenzen (Brady, 2006). Hingegen wurden während der Enzyersatztherapie von Morbus Fabry und Morbus Pompe neutralisierende Antikörper detektiert, die zum Teil erheblich die Effektivität der Therapie reduzierten (Kishnani u. a., 2007; Linthorst u. a., 2004). Bei der Behandlung von Morbus Gaucher, die ebenfalls bei Patienten die Entstehung von Antikörpern induziert, von denen wiederum nur ein geringer Anteil eine hemmende Wirkung dieser Antikörper entwickelt, ist im Verlauf bei vielen Patienten ein Rückgang des Antikörpertiters zu

verzeichnen (Rosenberg u. a., 1999; Richards u. a., 1993). Dies impliziert die Entwicklung einer Immuntoleranz in Bezug auf das rekombinante Fremdeiweiß. Vergleichbare Titerabfälle wurden bei Patienten mit MPS I, II und VI beschrieben (Beck, 2010).

Tabelle 1.2: Zugelassene Medikamente für Enzyersatztherapie			
LSD	Enzymdefizienz	Pharmakon	Quelle
M. Gaucher Typ I	β -Glucocerebrosidase	Imigucerase, Cerezyme®	Cox, 2010; Desnick, 2004; Barton u. a., 1993
M. Fabry	α -Galactosidase	1) Algalsidase α , Replagal® 2) Algalsidase β , Fabrazyme®	1) Ramaswami, 2011; Beck, 2009 2) Banikazemi u. a., 2007; Schiffmann u. a., 2001
MPS I (M. Hurler)	α -L-Iduronidase	Laronidase, Aldurazyme®	Clarke u. a., 2009; Wraith u. a., 2004
MPS II (M. Hunter)	α -L-Iduronat-Sulfatase	Idursulfase, Elaprase®	Hoffmann u. a., 2011; Wraith u. a., 2008
MPS VI (M. Maroteaux-Lamy)	Arylsulphatase B	Galsulfase, Naglazyme®	Harmatz u. a., 2010; Karageorgos u. a., 2007
M. Pompe	α -Glucosidase	Alglucosidase α , Myozyme®	Nicolino u. a., 2009; Winkel u. a., 2004

Als dritte Therapieoption steht derzeit die Substratreduktionstherapie zur Verfügung. Die Idee dieses Verfahrens besteht darin, anstelle der Enzymaktivität und damit den Abbau des Speichermaterials zu steigern, die Menge des Speichermaterials zu reduzieren, indem dessen Synthese gehemmt wird. Das erste und bisher einzige Therapeutikum dieser Art ist Miglustat® (Zavesca R, Actelion Pharmaceuticals, Allschwil/Basel, Schweiz). Es ist für die Behandlung von Morbus Gaucher und Morbus Niemann-Pick Typ C zugelassen (Wraith u. a., 2010; Patterson u. a., 2007; Cox u. a., 2003; Cox u. a., 2000). Dieser oral applizierte Aminosäure (N-butyldeoxy-nojirimycin) ist durch Inhibition der Glucosyltransferase in der Lage die Synthese von Glucosylceramiden zu reduzieren, die bei Morbus Gaucher akkumulieren und eine

Vorstufe von Glycosphingolipiden darstellen, dem Speichermaterial des Morbus Niemann-Pick Typ C (Platt u. a., 1994).

1.3. α -Mannosidose (OMIM-Nr.: 248500)

Eine dieser seltenen, autosomal rezessiv vererbten Lysosomalen Speichererkrankungen ist α -Mannosidose. Ursache ist ein Defekt des lysosomalen Enzyms α -Mannosidase, wodurch der Abbau von mannosehaltigen Kohlenhydratgruppen an Glykoproteinen gestört ist. Die Prävalenz unter Lebendgeborenen beträgt 1:500.000 (Meikle u. a., 1999). Auch bei α -Mannosidose ist die klinische Variabilität erheblich, sowohl die Intensität als auch die Anzahl an Beeinträchtigungen ist mannigfaltig. Außerdem gibt es Unterschiede im Krankheitsbeginn und im weiteren Krankheitsverlauf, manche Patienten versterben bereits im frühen Kindesalter, die Mehrzahl der Patienten erlebt das Erwachsenenalter und viele werden älter als 50 Jahre alt. Derzeit wird eine Einteilung in drei verschiedene Schweregrade vorgenommen, wobei die Übergänge fließend sind und die meisten Patienten dem klinischen Typ 2 zuzuordnen sind (Tabelle 1.3) (nach Malm & Nilssen, 2008).

Tabelle 1.3: Einteilung von α-Mannosidose in klinische Typen			
	<u>Typ 1</u> milde Form	<u>Typ 2</u> moderate Form	<u>Typ 3</u> schwere Form
Zeitpunkt der Diagnose	nach dem 10. Lj. (late onset)	vor dem 10. Lj.	unmittelbar
Progression	sehr langsam	langsam	deutlich
Zentrale Beeinträchtigung		Ataxie im Alter von 20 bis 30 Lj.	frühzeitig
			früher Tod aufgrund primärer ZNS-Beteiligung oder Myopathie

Die Betroffenen können zunächst bei Geburt normal erscheinen, wobei sich klinische Zeichen entsprechend des vorliegenden Typs im weiteren Lebensverlauf unterschiedlich früh manifestieren. Viele Patienten zeigen zunächst eine Gruppe an

unspezifischen Symptomen, die erst in der Summe klinisch an eine der seltenen Lysosomalen Speichererkrankungen denken lässt.

Die wichtigsten Symptome sind Immunschwäche mit rezidivierenden Infekten vor allem im ersten Lebensjahrzehnt; psychomotorische Entwicklungsverzögerung; mentale Retardierung (IQ-Durchschnitt 60 bis 80); Dysarthrie, Sprachentwicklungsstörung; Psychosen; Hörstörung (Schallempfindungsschwerhörigkeit) bis Taubheit; korneale Trübung, retinale Degeneration, Katarakt, Strabismus; skelettale Veränderungen wie Dysostosis multiplex (Veränderungen am Schädel, J-förmige Sella, proximal zugespitzte Metacarpalia, Wirbelsäulenveränderungen wie ventrale Nasenbildung im thoracolumbalen Übergang, Hypoplasie der basalen Anteile des Os ilium), Skoliose, Deformitäten des Sternum, Gelenkanomalien, später Polyarthropathien vor allem Coxarthrose; Makrocephalie mit prominenter Stirn, typische faciale Dysmorphie mit groben Gesichtszügen, abgerundeten Augenbrauen, flachem Nasenrücken, Makroglossie, weit auseinander stehenden Zähnen und Prognathie; Hepatosplenomegalie, Herniationsneigung, muskuläre Schwäche, motorische Entwicklungsverzögerung, Gangbildstörungen in Form von cerebellärer Ataxie, pathologische Reflexe. Im weiteren Verlauf kommt es in der Regel zu zunehmender Verschlechterung der mentalen, neuromuskulären und motorischen Funktionen, sowie der Skelettstruktur und der Sprache (Malm & Nilssen, 2008; Gutschalk u. a., 2004; Bennet u. a., 1995; Niemann u. a., 1996; Autio u. a., 1982).

Ausgelöst wird α -Mannosidose durch den Mangel an lysosomaler α -Mannosidase (EC 3.2.1.24), einem essenziellen Enzym des Glykoproteinabbaus. Durch heterogene Mutationen im Gen *Man2B1*, das auf Chromosom 19p13.2-q12 lokalisiert ist und für das lysosomale Enzym α -Mannosidase kodiert (Kaneda u. a., 1987), kommt es zu Veränderungen der Funktionalität und zur Defizienz der lysosomalen α -Mannosidase. Physiologisch kommt dieses Enzym, mit Ausnahme der Erythrozyten, ubiquitär in eukaryotischen Zellen vor. Es handelt sich um eine Exoglycosidase, die im Rahmen des lysosomalen Abbaus α 1-2-, α 1-3- und α 1-6-verbundene Mannosereste von freien Asparagin(N)-vernetzten Glykanen abspaltet (al Daher u. a., 1991).

Zusätzlich ist die lysosomale α -Mannosidase ebenfalls beteiligt an der enzymatischen Abspaltung von Mannoseresten von N-vernetzten Glykanen, die an nativen lysosomalen Proteinen gebunden sind (Damme u. a., 2011). Eine Enzymdefizienz hat entsprechend einerseits eine Hypermannosylierung lysosomaler

Proteine zur Folge (Damme u. a., 2011; Blanz u. a., 2008; Stinchi u. a., 1999), andererseits kommt es durch das Fehlen der α -Mannosidase zu intralysosomaler Akkumulation von unverzweigten mannosehaltigen Oligosacchariden in Zellen der peripheren Gewebe sowie des peripheren und zentralen Nervensystems, da deren Degradierung nicht vollständig ablaufen kann (Sun & Wolfe, 2001).

Diese lysosomalen Ablagerungen gehen mit der Vergrößerung der Lysosomen und daraus resultierend mit der Erhöhung lysosomaler Membranproteine wie LAMP1 und LAMP2 einher. Da diese Proteine Bestandteile der lysosomalen Membran darstellen, sind sie in Gewebeproben gesunder und erkrankter Menschen und Tiere detektierbar und werden bei Volumenzunahme der Lysosomen vermehrt exprimiert. LAMP1 und LAMP2 können entsprechend zur Beurteilung der lysosomalen Akkumulation von Speichermaterial herangezogen werden. Der direkte Nachweis der pathologisch abgelagerten Zuckerreste wird mittels Zuckerextraktion und Dünnschichtchromatographie erbracht. Bei diesen Verfahren können die unterschiedlich mannosehaltigen Oligosaccharide (M2 bis M9, zwei bis neun Mannosereste gebunden), die in den Lysosomen akkumulieren, in einzelne Banden aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. In Geweben nicht an α -Mannosidose erkrankter Menschen und Tiere sind diese Zucker aufgrund ihrer geringen Konzentration nicht nachweisbar. Morphologisches Korrelat der Akkumulation von mannosehaltigen Oligosacchariden ist, wie bereits oben erwähnt, das Vorhandensein von licht- und elektronenmikroskopisch sichtbaren Speichervakuolen in Zellen (s. Abb. 1.3).

Entscheidendes Kriterium zur Diagnosestellung am Patienten ist die Messung der spezifischen Enzymaktivität der α -Mannosidase in Leukozyten oder anderen kernhaltigen Zellen aus dem Blut (Nilssen u. a., 2011; Malm & Nilssen, 2008; Tranchant u. a., 1991). Weitere hinweisende Kriterien sind die Nachweise von erhöhten Oligosaccharidkonzentrationen im Serum und im Urin (Nilssen u. a., 2011). Da kein Zusammenhang zwischen der Art der zu Grunde liegenden Mutationen und dem Schweregrad und Verlauf der Krankheit besteht, scheinen neben der α -Mannosidaseaktivität weitere Faktoren eine zusätzliche, entscheidende Rolle für das variable klinische Krankheitsspektrum der α -Mannosidose zu spielen. Als Beispiel werden Umwelteinflüsse und epigenetische Faktoren vermutet (Berg u. a., 1999), sowie Maßnahmen im Rahmen von Frühförderung und die Qualität des Gesundheitssystems im Ganzen. Aufgrund der fehlenden Genotyp-Phänotyp Korrelation sind Ergebnisse von Genuntersuchungen entsprechend bezüglich des

Krankheitsprogresses wenig aussagekräftig, haben aber neben der Enzymaktivitätsmessung (Enzymassay) ebenfalls krankheitsbeweisenden Charakter. Derzeit steht keine Therapie für Patienten mit α -Mannosidose zur Verfügung.

Neben dem Krankheitsbild beim Menschen (Öckerman 1967) ist α -Mannosidose ebenfalls für Rinder (Hocking, u. a., 1972), Hauskatzen (Burditt u. a., 1980) und Meerschweinchen (Robinson u. a., 2008; Crawley u. a., 1999) beschrieben. Durch gezielte Ausschaltung des Gens für die lysosomale α -Mannosidase (Man2B1) und damit deren Inaktivierung wurde ein α -Mannosidose Mausmodell generiert (Stinchi u. a., 1999). Diese so genannten α -Mannosidase Knock-out-(KO) Mäuse weisen neben dem mit den erkrankten Menschen übereinstimmenden biochemischen und histopathologischen Erscheinungsbild zudem neuropathologische Veränderungen und Verhaltensauffälligkeiten auf, die denen der Patienten ähneln (Caeyenberghs u. a., 2006; D'Hooge u. a., 2005; Stinchi u. a., 1999). Auch mit Hilfe dreier dieser Tiermodelle für α -Mannosidose (Hauskatzen, Meerschweinchen und Mäuse) werden derzeit mögliche Therapieoptionen beforscht.

Stammzelltransplantationen wurden bisher bei wenigen betroffenen Personen mit variierenden Effekten, aber mit zuletzt vielversprechenden Resultaten durchgeführt. Neben peripherer, organbezogener Entspeicherung, aber fehlendem Effekt auf die cerebrale Akkumulation von Speichermaterial (postmortale Datenerhebung, Will u. a., 1987) wurden bei früher Stammzelltransplantation bei Katzen die Verhinderung des neurologischen Verfalls und im Fall eines Patienten durch die Transplantation die Reduktion von immunologischen und organspezifischen Symptomen, sowie ebenfalls die Stabilisierung der neurokognitiven Funktionen beschrieben (Wall u. a., 1998; Walkley u. a., 1994). Ähnliche Ergebnisse sind in weiteren Fallvorstellungen erreicht worden, vor allem die Verbesserung der motorischen, funktionellen und sozialen Fähigkeiten, der Fortschritt bei der expressiven Sprachentwicklung und die Zunahme der akustischen Fähigkeiten bis zu normaler Hörleistung sind hierbei zu erwähnen (Grewal u. a., 2004; Albert u. a., 2003). Die möglichen Vorteile der Stammzelltransplantation sollten jedoch stets im Kontext des individuellen und allgemeinen Risikos, sowie der erhöhten Mortalität und Morbidität dieser Therapieform betrachtet werden.

Die Enzyersatztherapie wurde bisher an Meerschweinchen und KO-Mäusen durchgeführt (Blanz u. a., 2008; Auclair & Hopwood, 2007; Crawley u. a., 2006; Roces u. a., 2004). Die Reduktion von Speichermaterial konnte in fast allen Organen

in beiden Tiermodellen für α -Mannosidose erreicht werden. Sowohl in den peripheren Geweben also auch im peripheren Nervensystem, wofür vor allem das Ganglion Gasseri (trigeminal) untersucht wurde, zeigte sich lichtmikroskopisch die Verringerung und Abwesenheit von lysosomalen Speichervakuolen und biochemisch die Reduktion von Oligosacchariden infolge der Enzymsubstitution. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde im Mausmodell zudem ein Absinken der neutralen Oligosaccharide um 70 % auf unter 30 % im Gehirn (ZNS) verzeichnet (Blanz u. a., 2008; Roces u. a. 2004).

Bei der Enzyersatztherapie von α -Mannosidase KO-Mäusen ist in Vorarbeiten zu dieser Arbeit eine schnelle humorale Immunreaktion beschrieben worden, die sich gegen das humane und damit artfremde und rekombinante Substitutionsenzym richtet. Diese Immunreaktion ist als vergleichbar mit Ergebnissen von Patienten mit zugelassener Enzyersatztherapie (s. 1.2.) zu sehen (Blanz u. a., 2008; Roces, 2005). Ein Anstieg des Antikörpertiters (IgGs) gegen substituierte, humane rekombinante α -Mannosidase wurde nach 1-4 Enzymgaben, abhängig von der Menge an appliziertem Enzym, detektiert (s. 3., Roces, 2005). Die α -Mannosidase-aktivität wurde durch das Vorhandensein dieser Antikörper weniger als 10 % reduziert. Demnach wurden vom Immunsystem der behandelten α -Mannosidase KO-Mäuse Antikörper gebildet, die das substituierte Enzym nicht neutralisieren. (Roces, 2005).

1.4. Bluthirnschranke

Die Bluthirnschranke ist eine physiologische Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem ZNS. Sie dient der Abgrenzung des Gehirns vom Blut und der Aufrechterhaltung der Milieubedingungen im Gehirn. Sie besteht aus Kapillarendothel mit dichten *Tight junctions*, den Basallaminae der Kapillaren und der von Astrozyten gebildeten Gliagrenzmembran (Lüllmann-Rauch, 2006). Lipophile Stoffe und Gase sind in der Lage die Bluthirnschranke mittels passiver Diffusion zu überwinden (Liu u. a., 2004). Im Gegensatz dazu benötigen hydrophile Substanzen spezifische Transportmechanismen um das ZNS zu erreichen. Hierzu gehören Carrier wie GLUT-1, die die erleichterte Diffusion ermöglichen, ATP-abhängige Pumpen, wie der MDR1-Transporter (Multi-drug-resistance-Transporter) und Rezeptoren zur rezeptor-

vermittelten Endozytose (Pardridge, 2007; Hermann & Bassetti, 2007; Simpson u. a., 2007).

Die Mehrheit an Proteinen kann die Bluthirnschranke nicht penetrieren. Einige überwinden sie jedoch mittels vesikulärem transzytotischen Transport (Lebowitz, 2005). Als Varianten hierfür sind sowohl die rezeptorvermittelte als auch die adsorptionsvermittelte, durch elektrostatische Wechselwirkungen ausgelöste Endozytose beschrieben (Abbott u. a., 2010; Hervé u. a., 2008). Theoretisch möglich ist auch der Influx auf unspezifischem Wege über Caveolae, 50-100 nm große Ω -förmige Invaginationen der Plasmamembran, die sich an manchen Zellen wie zum Beispiel dem Gefäßendothel abschnüren und so Makromoleküle endozytotisch in Zellen aufnehmen bzw. transzytotisch durch Endothelbarrieren durchschleusen (Lüllmann-Rauch, 2006). Diese Transportprozesse mittels Caveolea finden jedoch an zentralen Gefäßen deutlich seltener als an peripheren Gefäßen statt (Abbott u. a., 2010; Hervé u. a., 2008). Unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen, wie zum Beispiel bei Entzündungen, Hirntumoren, neurodegenerative Erkrankungen oder nach Schlaganfällen kann es zu einer Störung der Schrankenintegrität kommen (Zlokovic, 2008).

Die Ausbildung der Bluthirnschranke findet bei Mäusen in den ersten Lebenswochen statt, der genaue Zeitpunkt ist unklar. In der neonatalen Maus wurde ein MPR-vermitteltes Transportsystem beschrieben, welches die bei Enzyersatztherapie im Mausmodell von MPS VII und MPS III applizierten lysosomalen Enzyme β -Glucuronidase und Sulfamidase MPR-abhängig über die Bluthirnschranke transportiert (Urayama u. a., 2008; Urayama u. a., 2004).

Der Vergleich der Influxraten phosphorylierter β -Glucuronidase in das Gehirngewebe zeigte eine massive Enzymaufnahme über die Bluthirnschranke bei zwei Tage alten Mäusen. Im Alter von sieben bis acht Wochen war diese Enzymaufnahme in das Gehirngewebe über die Bluthirnschranke nicht mehr signifikant und bei adulten Mäusen gar nicht nachweisbar. Das MPR-vermittelte Transportsystem für phosphorylierte β -Glucuronidase sei entsprechend postnatal an der Bluthirnschranke vorhanden, im Alter von sieben bis acht Wochen herunterreguliert und stehe im Erwachsenenalter der Mäuse nicht mehr zur Verfügung (Urayama u. a., 2004).

1.5. Fragestellung

Aufbauend auf den Ergebnissen eines von der EU finanzierten Projekts zur Erforschung von Therapieoptionen der seltenen Lysosomalen Speichererkrankung α -Mannosidose (EURAMAN) (Roces u. a., 2004) sowie auf Versuchen der Arbeitsgruppe Saftig/ Blanz des Biochemischen Instituts der Medizinischen Fakultät der CAU zu Kiel, die zeigten, dass Enzymsubstitution dosisabhängig zu einer Reduktion der Akkumulation von Speichermaterial in peripheren und zentralen Geweben von KO-Mäusen führt, wurde diese Arbeit im Rahmen eines zweiten von der EU geförderten Projekts (HUE-MAN) zur Erforschung von Therapieoptionen der seltenen Lysosomalen Speichererkrankung α -Mannosidose durchgeführt.

In den Vorversuchen wurde in Proben peripherer Organe nach Injektion von zwei Mal 25 mU/mg KG rekombinanter humaner α -Mannosidase (rhLAMAN) noch geringgradig mannosehaltige Oligosaccharide mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen, nach Zugabe von zwei Mal 500 mU/mg KG rhLAMAN glichen die Ergebnisse denen der WT-Mäuse. Zudem konnte nach Applikation von vier Mal 500 mU/mg KG rhLAMAN eine Reduktion der krankheitstypischen Oligosaccharide in Gehirnproben von KO-Mäusen detektiert werden (Blanz u. a., 2008). Nachdem die Effektivität der Enzymersatztherapie in Geweben behandelter KO-Mäuse durch einen Rückgang an histologisch nachweisbaren Speichervakuolen, sowie biochemisch in Dünnschichtchromatographien durch die Verminderung mannosehaltiger Oligosaccharide und mittels Westernblotanalysen durch die Reduktion des mit der lysosomalen Speicherung korrelierenden Proteins LAMP1 dargestellt werden konnte (Blanz u. a., 2008), war es Ziel dieser Arbeit in den folgenden Versuchen zum Einen ein Therapiemodell zu entwickeln, das letztlich in Form einer Langzeittherapie auf die Behandlung der menschlichen Patienten übertragbar wäre, und zum Anderen zu erforschen, auf welchem Weg das substituierte Enzym in die Zellen und ggf. über die Bluthirnschranke gelangt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Chemikalien, Geräte, Materialien

Eine ausführliche, alphabetische Auflistung der verwendeten Chemikalien, Geräte und Materialien, sowie die Zusammensetzungen der im Folgenden genannten Lösungen finden sich im Anhang.

2.1.2 Antikörper

In Tabelle 2.1 sind alle Primär- und Sekundärantikörper aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die Antikörper wurden für den Westernblot (WB) in 5 % Milchpulver in TBS-T, für die Immunfluoreszenz (IF) in 3 % BSA in 8 % Saponin-PBS und für die Immunhistologie (IH) in 0,2 % BSA/ 0,5 % Triton/ 4 % NGS (Primärantikörper) bzw. in 0,1 M PB mit 0,25 % Triton (Sekundärantikörper) und für den ELISA in PBS der Verdünnung entsprechend aufgenommen.

Tabelle 2.1: Verwendete Antikörper				
Antikörper (AK)	erzeugt in	WB	IH (IF)	Referenz
Primärantikörper				
α -Aktin	Kaninchen	1:3000	-	Sigma, St. Louis, USA
α -Lamp1	Ratte	1:200	1:200 (IF)	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
α -Lamp2	Ratte	1:200	-	DSHB, Iowa City, USA
α -NF 68	Maus	1:1000	-	Sigma, St. Louis, USA
α -NeuN	Maus	1:1000	1:500	Chemicon, Hofheim
α -CD 11b	Maus	1:500	-	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
α -MBP	Ratte	1:500	1:300	Chemicon, Hofheim
α -GFAP	Kaninchen	1:1000	1:500	DAKO, Glustrup, DK
α -MPR300 Holsten	Kaninchen	1:1000	-	von Figura, Uni Göttingen
α -MPR300 CTII20	Kaninchen	1:1000	-	von Figura, Uni Göttingen
α -MPR46 IIa	Kaninchen	1:1000	-	von Figura, Uni Göttingen

α -MPR46 MSC I	Kaninchen	1:1000	-	Klumperman u. a., 1993
α -Laman pab, 50% glycerol		1:2000/ 1:10000	-	Zymanex, Stockholm, Schweden
α -Laman antiserum #7394	Maus	1:2000/ 1:10000	1:400 (IF)	Damme, Uni Göttingen
α -Calbindin	Kaninchen	-	1:500	Chemicon, Hofheim
α -F4/80-FITC	Ratte	-	1:300	Serotec, Düsseldorf
biotinyliertes GSA Lecitin		-	1:200	Vector Labs, Burlingame, USA
Sekundärantikörper				
α -Kaninchen, HRP gekoppelt	Esel	1:10000	-	Santa Cruz, Heidelberg
α -Ratte, HRP gekoppelt	Ziege	1:10000	-	Dianova, Hamburg
α -Maus, HRP gekoppelt	Schaf	1:10000	1:2000 (ELISA)	Dianova, Hamburg
α -Kaninchen Alexa Fluor 488	Ziege	-	1:1000, 1:750 (IF)	Invitrogen, Karlsruhe
α -Ratte Alexa Fluor 488	Ziege	-	1:1500, 1:750 (IF)	Invitrogen, Karlsruhe
α -Ratte Alexa Fluor 594	Zeige	-	1:750 (IF)	Invitrogen, Karlsruhe
α -Maus Alexa Fluor 594	Ziege	-	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Streptavidin 594	-	-	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.3 Mausstämme

Bei dieser Arbeit kamen α -Mannosidase Knock-out-Mäuse (KO) (129SV/J) generiert von Stinchi u. a. 1999 als Krankheitsmodell und als Kontrolltiere Wildtyp-Mäuse (WT) (Wildtyp CD53S^{+/+}, mit einem gemischten genetischen Hintergrund aus C 57 BL/6J x 129 SV/J, Aufzucht der AG Saftig, CAU zu Kiel) zum Einsatz.

2.1.4 Zelllinien

Die in Tabelle 2.2 aufgelisteten Zelllinien wurden bei 37° C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Tabelle 2.2: Verwendete Zelllinien		
Zelllinie	Eigenschaften	Referenz
MPR46 -/-	embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen	Pohlmann u. a., 1995
MPR300 -/-	embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen	Pohlmann u. a., 1995
MPR46/300 -/-	embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen	Pohlmann u. a., 1995
PS 1 +/+ SV	embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen	Hartmann, Leuven, B
COS-7	Nieren-Fibroblasten aus der afrikanischen Grünen Meerkatze <i>Cercopithecus aethops</i> , immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen	ATCC, Wesel
HeLa	menschliche epithelartige Zelllinie aus einem Zervix-Karzinom	ATCC, Wesel
CHO-K1	Hamster Ovarzellen	ATCC, Wesel
BHK	Baby Hamster Nierenzellen	ATCC, Wesel

2.1.5 Substitutionsenzym

Die rekombinante humane lysosomale α -Mannosidase (rhLAMAN) wurde von Zymanex A/S, DK, mit Hilfe gentechnischer Methoden in CHO Zellen produziert und vor Gebrauch gereinigt und aufbereitet (siehe WIPO Patent Application WO/2011/103877). Einerseits wurde rhLAMAN Mäusen in unterschiedlichen Dosierungen intravenös injiziert (Enzymersatztherapie), andererseits wurde das Enzym Zellmedien im Rahmen von Endozytoseassays (2.2.1.7) in unterschiedlichen Mengen zugefügt und die Zellen wurden darin inkubiert.

2.2. Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1. Maushaltung

Sowohl die α -Mannosidase KO-Mäuse als auch die WT-Mäuse wurden in den Räumen der tierexperimentellen Einrichtung der Universität Kiel gehalten. Die Tiere lebten bei einer Raumtemperatur von 19 bis 21° C und einer Luftfeuchtigkeit von 45 bis 60 % in Käfigen, die individuell belüftet wurden. Ein Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden Helligkeit und 12 Stunden Dunkelheit wurde eingehalten.

2.2.1.2. Perfusion der Mäuse und Präparation ihrer Organe

Nach der Injektion einer zum Tode führenden Dosis von 250-300 μ l Anästhetikum (1:10 verdünntes Rompun, 800 mg Ketamine HCL) mittels 0,4 x 19 mm Kanüle durch die Haut in den Intraperitonealraum wurden zunächst folgende Reflexe der Maus getestet: 1) Lidschlagreflex, 2) Kopfhaltereflex, 3) motorische Reaktion auf starke Stimulation der Hinterpfoten. Waren diese ausgefallen bzw. deutlich abgeschwächt, konnte mit den Perfusionsvorbereitungen begonnen werden. Hierfür wurde nach Abtötung der äußerlich anheftenden Bakterien durch 75 % Ethanol zunächst der Bauchraum durch einen Schnitt eröffnet, im Anschluss folgte die Beträufelung der Bauchorgane mit 30 μ l Anästhetikum und die Eröffnung des Thorax. Bei vorhandener Herzaktion wurde der linke Ventrikel mittels Butterfly punktiert und das mit BSA oder PBS gefüllte Perfusionsgerät angeschlossen. Anschließend erfolgten das sofortige Eröffnen des rechten Atriums und der Start der Perfusion. Diese war so lange durchzuführen bis eine deutliche Blutleere der inneren Organe (vor allem Leber/ Niere dienten als visuelle Kontrolle) eingetreten war. Dies war in der Regel nach 3 Minuten der Fall. Bei einer geplanten reinen histologischen Auswertung der Mäuse folgte im Anschluss eine Nachfixierung mit 4 % PFA in 0,1 M PB ph 7,4 (PFA). Nach erfolgreicher Perfusion wurden die Organe mit Hilfe von Skalpell, Schere und Pinzette frei präpariert und vollständig entnommen. Für weitere Untersuchungen wurden die Organe für biochemische Analysen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren oder für immunhistologische Auswertungen in PFA über mindestens 2 Stunden bei 4° C fixiert. Die Aufbewahrung der gefrorenen Proben erfolgte im Kühlschrank bei -20° C oder -80° C.

2.2.1.3. Weitere Probeentnahmen der Maus

Blutproben wurden in der Regel vor bzw. nach der Injektion von rhLAMAN und vor der Perfusion aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) und für 60 Minuten bei 4° C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 30 Minuten bei 4° C und 4500 rpm. Das überstehende Plasma wurde vorsichtig entnommen und in 1 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -20° C eingefroren.

2.2.1.4. Kultivierung und Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden bei 37° C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in Schalen mit Zellkulturmedium DMEM High Glucose mit 10 % fötalem Kälberserum (+10 % FCS) und 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (+1 % PS) kultiviert. Bei vorliegender Konfluenz der Zellen in einer Schale wurden diese passagiert. Hierbei wurden die Zellen zunächst unter der Sterilbank mit PBS gewaschen und Trypsin zugegeben (2 ml in 10 cm Schalen). Nach kurzer Inkubationszeit wurden die Zellen durch Schwenken und Klopfen gelöst. Im Anschluss wurden 8 ml (10 cm Schale) Zellkulturmedium zugegeben und die Zellen durch wiederholtes Abspülen abgelöst, suspendiert und aufgenommen. Entsprechend der Zellzahl, die mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde, fand die Ausplattierung auf neuen Platten mit frischem Zellkulturmedium statt (3 cm: 0,75x 10⁶ Zellen, 6 cm: 1,5x 10⁶ Zellen, 10 cm: 5x 10⁶ Zellen).

2.2.1.5. Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden im 37° C warmen Wasserbad so lange aufgetaut bis noch ein kleiner Eiskern verblieben war. Im Anschluss wurden die Zellen unter der Sterilbank mit 5 ml kaltem Zellkulturmedium DMEM +10 % FCS +1 % PS resuspendiert und für 5 Minuten bei 800 rpm herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 10 ml 37° C warmem Zellkulturmedium DMEM +10 % FCS +1 % PS aufgenommen und in 10 cm Schalen bei 37° C in einem Begasungsbrutschrank kultiviert (s. 2.2.1.3). Wenn bei der Kontrolle der Zellen in Bezug auf das Anwachsen am nächsten Tag viele tote Zellen im Medium schwammen, wurde dieses ausgetauscht.

2.2.1.6. Ernten von Zellen

Nach dem Abkühlen im Kühlschrank auf 4° C wurden die Zellkulturmedien verworfen und die Zellen in drei Waschgängen mit kaltem PBS gewaschen. Die abgestorbenen, frei im Medium flottierenden Zellen wurden nach jedem Waschgang mit dem Medium zusammen verworfen. Im Anschluss wurde je 1 ml PBS-Complete pro Zellschale zugefügt und die Zellen wurden mittels Zellschaber abgekratzt. Die abgeschabten Zellen wurden zunächst in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen auf Eis gelagert und des Weiteren bei 4500 rpm für 10 Minuten bei 4° C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet wurde bei -20° C gelagert oder gleich weiterverarbeitet. Hierbei wurde das Pellet in je 100 µl PBS-Complete +PEFA +1 % Triton aufgenommen, zweimal für 10 Sekunden mit 30 % der Maximalkapazität eines Ultraschallbades behandelt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Pellet noch einmal mit Ultraschallwellen beschallt und dann bei 14000 rpm für 10 Minuten bei 4° C herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde in neue 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und abhängig vom Versuchsdesign entsprechend weiter verarbeitet (2.2.2.2 ff).

2.2.1.7. Endozytoseassay

Die Zellen wurden nach ausreichendem Wachstum zunächst unter der Sterilbank mit PBS gewaschen und für 30 Minuten in DMEM ohne FCS aber +1 % PS inkubiert (hungern lassen). Im Anschluss erfolgte die Zugabe von je 1,5 ml Endozytosemedium (DMEM +1 % FCS +1 % PS) mit unterschiedlichen Zusätzen. Zum Einen wurde rhLAMAN in verschiedenen Dosierungen (0,001 mg, 0,01 mg, 0,1 mg, 0,5 mg, 0,75 mg, 1,0 mg) und zum Anderen zum Teil zusätzlich zu der Enzymgabe 10 mM M6P zugefügt. Zur Kontrolle durchliefen andere Zellen stets die gleiche Prozedur in Zellkulturmedium ohne Zugaben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37° C wurden die Medien abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten in 2 ml normalem Zellkulturmedium (DMEM +10 % FCS +1 % PS) gelagert (chase). Anschließend erfolgte das Ernten der Zellen (2.2.1.5) und deren weitere Verarbeitung.

2.2.1.8. Immunfluoreszenz (IF)

Zellen wurden auf Coverslips ausgesät (2.2.1.4) und einem Endozytoseassay (2.2.1.7) unterzogen, dessen Inkubationszeit 3 Stunden ausmachte. Nach

30 minütiger Lagerung der Zellen in 2 ml normalem Zellkulturmedium (DMEM +10 % FCS +1 % PS) (chase) erfolgten anschließend zwei Waschgänge mit eiskaltem PBS und eine Fixierung mit 4 % PFA in PBS für 20 Minuten bei 37° C. Im Anschluss wurden die Zellen erneut zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und im Kühlschrank auf 4° C abgekühlt. Um im weiteren Verlauf die Zellen permeabel zu halten wurden sie für 5 Minuten bei RT mit 0,2 % Saponin in PBS bedeckt und im Anschluss zur Absättigung der freien Aldehydgruppen mit 0,12 % Glycin in 8 % Saponin-PBS für 10 Minuten bei RT versetzt. Danach wurden die Zellen einmal mit 0,2 % Saponin in PBS gewaschen und dann für 30 Minuten bei RT um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern mit 3 % BSA in 8 % Saponin-PBS blockiert. Die folgenden Schritte erfolgten in einer feuchten Kammer: Je 30 µl der Primärantikörperverdünnung wurden auf Parafilm pipettiert und die mit Zellen bedeckten Coverslips wurden so aufgelegt, dass sie in der Lösung lagen. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die Zellen viermal mit 0,2 % Saponin in PBS gewaschen. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurde auf die gleiche Weise wie der Primärantikörper ebenfalls für 1 Stunde inkubiert und zusätzlich abgedunkelt gelagert. Anschließend wurden die Coverslips fünfmal mit 0,2 % Saponin in PBS und zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen sowie kurz auf Zellstoffpapier abgetupft. Die fertigen Coverslips wurden dann in Mowiol +DABCO +DAPI eingedeckelt und für eine Nacht bei RT und im Anschluss bei 4° C im Dunkeln gelagert. Die Auswertung erfolgte mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Zeiss, Göttingen).

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1. Herstellung von Proteinlysaten

Alle hier aufgelisteten Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden die Organe bzw. Organanteile abgewogen und entsprechend des Gewichts wurde neunmal soviel Lysis-Puffer zugefügt. Die Homogenisierung des Gewebe-Puffer-Gemisches erfolgte nach Zugabe von etwa 50 Precellys-Keramik-Kügelchen mit dem „precellys 24“-Gewebehomogenisators für zweimal 15 Sekunden bei 5000 rpm. Nach einer Inkubationszeit von 30–60 Minuten wurden die Gewebeproben zweimal für 20 Sekunden mit 30 % der Maximalkapazität eines Ultraschallbades behandelt und im Anschluss für 15 Minuten bei 12000 rpm bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand

wurde abpipettiert und weiter verarbeitet (2.2.2.2 bis 2.2.2.6) oder bei -20° C oder -80° C aufbewahrt.

2.2.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Protokoll der BCA-Methode nach Pierce (Kit der Firma Pierce (Rockford, USA)) in 96-well-Platten. Proteinlysate wurden hierfür 1:10 mit Lysis-Puffer vorverdünnt, davon sowie von Plasmaproben wurden je 10 µl und von Zelllysaten je 5 µl pro Wert genutzt. Als Standard dienten Verdünnungen der mitgelieferten BSA-Lösung (2 mg/ml) in deionisiertem Wasser. Nach Zugabe von je 200 µl Gebrauchslösung pro well und Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C erfolgte die photometrische Detektion der Extinktionswerte mittels Tecan Reader bei 562 nm. Es wurde aus Doppelwerten jeweils der Mittelwert berechnet.

2.2.2.3. Vorbereitung der Proben für SDS-PAGE und SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Nach der Durchführung von 2.2.2.1 und 2.2.2.2 wurde eine Menge von 200 µl der Protein- bzw. Zelllysate in der Regel auf 3 µg/µl mit Lysis-Puffer eingestellt. Diese wurden mit je 64 µl 4-fach Laemli-Puffer mit 4 % β-Mercaptoethanol versetzt und für 15 Minuten bei 55° C im Thermoblock inkubiert, wodurch eine Denaturierung von Proteinen und eine Anlagerung von negativer Ladung an diese erreicht wurde. Im Anschluss wurden die Proben direkt auf SDS-PAGE-Gele aufgetragen oder zunächst bei -20° C gelagert. Nach dem Zusammenbau der Gelelektrophoresekammer von BioRad mit hergestellten SDS-PAGE-Gelen (12,5 % Polyacrylamid im Trenngel) oder fertigen 4-12% NuPAGE-Gradientengelen wurde diese mit SDS-Elektrophorese-Puffer befüllt. Im Folgenden wurden in der Regel 10 µl (30 µg) der vorbereiteten Proben mittels Hemmiltonpipette in die Taschen des Sammelgels mit 4,5 % Polyacrylamid pipettiert, wobei nicht belegte Taschen mit einfachem Laemli-Puffer aufgefüllt wurden. Als Molekulargewichtsmarker wurden je 5 µl eines Gemisches aus gefärbten Proteinen mit definierten Molekulargewichtsgrößen genutzt. Da durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese negativ geladene Proteine der Größe nach entsprechend ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld aufgetrennt werden, wurde zur Konzentration der Proteine im Sammelgel zuerst für 10 Minuten eine Spannung von 100 V und im Anschluss zur Auftrennung der Proteine im

Trenngel eine Spannung bis 160 V angelegt. Der gewünschten Auftrennung entsprechend wurde diese nach unterschiedlich langen Zeitspannen beendet.

2.2.2.4. Westernblot (WB)

Für den Proteintransfer von Polyacrylamid-Gel auf Nitrozellulose-Membran wurde das ebenfalls elektrophoretische Tank-Blotting-Verfahren durchgeführt. Hierfür wurde Whatman-Papier ausgeschnitten und mit Transferpuffer (Tank-Blot-Puffer) befeuchtet. Nach Entfernen des Sammelgels wurde das Trenngel auf der mit Tank-Blot-Puffer befeuchteten Nitrozellulose-Membran zwischen zwei Whatman-Papiere gelegt. Dieses Konstrukt wurde wiederum zwischen zwei Schwämme gelegt und im Anschluss in die Tank-Blot Kammer von Biorad eingefügt. Diese wurde mit einem gefrorenen Kühlakku und Tank-Blot-Puffer befüllt. Der Proteintransfer mittels Elektrophorese erfolgte bei 4° C für 16 Stunden bei 20 V und abschließend bei 4° C für 30 Minuten bei 70 V.

2.2.2.5. Immunodetektion

Im Anschluss an den Westernblot wurde die Nitrocellulose-Membran für 30-60 Minuten bei RT bzw. für 16 Stunden bei 4° C unter kontinuierlichem Schütteln mit Blotto (5 % Milchpulver in TBS-T) versetzt um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Als nächster Schritt folgte die Bindung des Primärantikörpers. Dieser wurde in 3 ml Blotto entsprechend der vorgesehenen Verdünnung in 15 ml bzw. 50 ml Falconröhrchen angesetzt, worin wiederum die Nitrocellulose-Membran mit der proteinbeschichteten Seite nach innen für 3 Stunden bei RT unter kontinuierlichem Rollen inkubiert wurde. Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran dreimal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde entsprechend seiner Verdünnung in 15 ml Blotto angesetzt und die Nitrocellulose-Membran darin für 1 Stunde bei RT ebenfalls unter kontinuierlichem Rollen gelegt. Anschließend erfolgten erneut drei Waschgänge für je 10 Minuten mit TBS-T. Zur Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers wurde das ECL-Advanced Western Blotting Detektion Reagenz der Firma Amersham verwendet. Die Lösungen A und B wurden 1:1 gemischt und 400 µl des Gemisches wurden auf die zwischen zwei Folien liegende Nitrocellulose-Membran gegeben und für 5 Minuten inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Detektion und Photographie der Nitrocellulose-Membran mittels Chemolumineszenzkamera (LAS-3000mini, Fujifilm, Tokyo, Japan).

Bei hoher Intensität der Detektion wurde die Nitrocellulose-Membran erneut mit TBS-T gewaschen und danach erneut detektiert.

2.2.2.6. Enzymassay (EA)

Die Messung der spezifischen Aktivität von α -Mannosidase wurde nach nachfolgendem Protokoll durchgeführt (Tab. 2.3). Als Substrat kam 10 mM p-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid (Sigma N2127) in 0,2 M Citratpuffer und als Stopplösung 0,4 M Glycinlösung mit 1 M NaOH auf pH 10,4 eingestellt zum Einsatz. Bei der Durchführung des α -Mannosidaseassays wurden die Plasmaproben 1:100 in 0,9 % NaCl vorverdünnt und für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Von Proteinlysaten wurden 25 μ l +25 μ l 0,9 % NaCl, von Zelllysaten 10 μ l/ 15 μ l +40 μ l/ 35 μ l 0,9 % NaCl als Probenmaterial verwendet. Die Inkubationszeiten bei 37° C waren unterschiedlich und werden bei den Ergebnissen jeweils angegeben.

Tabelle 2.3_Durchführung des Enzymassays			
Probe: 2x	Probenmaterial	50 μ l	
	Citratpuffer	50 μ l	
	0,9 % NaCl	50 μ l	
	Substrat	50 μ l	
Probenleerwert:		Substratleerwert:	
Probenmaterial	50 μ l	Citratpuffer	50 μ l
Citratpuffer	50 μ l	0,9 % NaCl	100 μ l
0,9 % NaCl	100 μ l	Substrat	50 μ l
Prozedere:			
Stopplösung	500 μ l		
Zentrifugation	für 10 Minuten bei 13000 rpm		
Detektion	je 161 μ l pro well, bei 405 nm, Tecan Reader		

2.2.2.7. Zuckerextraktion (ZE)

Zur Analyse der mannosehaltigen Oligosaccharide (M2-M9) in Geweben wurden zunächst Zuckerextraktionen auf Eis durchgeführt. Hierfür wurden 100–120 μ g pro Organ (beim Gehirn ganze Gehirnhälfte) in 2 ml Schraubröhrchen, die zuvor mit etwa 50 Precellys-Keramik-Kügelchen befüllt wurden, abgewogen und mit je 100 μ l HPLC-Wasser pro 10 mg Gewebe versetzt. Anschließend erfolgte die Homogenisierung

dieses Gemisches mit „precellys 24“-Gewebehomogenisator für zweimal 15 sec bei 5000 rpm. 600 µl des Homogenisates/ Überstandes wurden für die weitere Prozedur abgenommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Auftauen der Proben für 10 Minuten bei 37° C auf einem Thermoblock wurde das Einfrieren und Auftauen ein zweites Mal wiederholt. Im Anschluss wurden die 600 µl Überstand in 15 ml Falconröhrchen pipettiert und dreimal für 10 sec mit 30 % der Maximalkapazität eines Ultraschallbades behandelt, das restliche Homogenisat wurde bei -20° C aufbewahrt. Je 2,6 ml HPLC-Methanol 100 % wurden zugefügt (1. Extraktion) und der entstandene Überstand 1 wurde nach Durchmischung (10 sec) und Zentrifugation (5 Minuten bei 4° C bei 4500 rpm) in Eppendorf-Reaktionsgefäßen auf Eis aufbewahrt. Das Pellet 1 wurde mit 1,3 ml HPLC-Methanol 80 % und Ultraschallbad gelöst (2. Extraktion). Nach Durchmischung (s.o.) und Zentrifugation (10 Minuten bei 4° C bei 4500 rpm) wurde der Überstand 2 entnommen und zusammen mit Überstand 1 und 910 µl Chloroform vermischt (3. Extraktion). Nach erneuter Durchmischung (s.o.) und Zentrifugation (5 Minuten bei 4° C bei 3300 rpm) wurde die obere Phase von etwa 6-7 ml abgenommen und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt, welches zuvor mit 0,25 g exchange resin von Biorad befüllt wurde. Die Probe wurde in dieser Form zunächst für 1 Stunde bei 4° C kontinuierlich gerollt und anschließend in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit durchlöcherter Deckel über Nacht in einer Vakuumzentrifuge (Christ (Alpha 1-4) (Kühlaggregat), Bachhofer Vacuum Concentrator (Rotor)) ausgetrocknet. Das entstandene Pellet 2 wurde mit 60 µl HPLC-Wasser (1 µl pro mg Organ) aufgelöst, so dass eine Endkonzentration von 1 mg/µl Gewebeprobe pro HPLC-Wasser vorlag. Bei Gehirnproben wurde die Auflösung mit 25 µl durchgeführt, so dass eine Endkonzentration von 4 mg/µl vorlag.

2.2.2.8. Dünnschichtchromatographie (Thin-Layer-Chromatographie (TLC))

Für das physikalisch-chemische Trennverfahren der Dünnschichtchromatographie wurde zunächst das Trägermaterial in Form von Silica Gel Platten von Merck für 10 Minuten bei 110° C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben aus der Zuckerextraktion (2.2.2.7) aufgetragen, wobei von Gehirnproben 5 µl (20 mg), von Leberproben 7,5 µl (7,5 mg), von Milzproben 10 µl (10 mg) und von Nierenproben 12,5 µl (12,5 mg) aufgetragen wurden. Die bestückte Platte wurde für 1 Stunde bei RT getrocknet und im Anschluss unter dem Abzug für 16 Stunden in Lösung 1 (50 Teile Butanol, 25 Teile 100 % Essigsäure, 25 Teile MilliQ-Wasser) gestellt, die

durch Kapillarkräfte aufwärts wandert. Nachdem die Platte erneut für 1 Stunde bei RT getrocknet und anschließend für 5 Minuten bei 110° C erhitzt wurde, erfolgte die weitere Auftrennung durch Lagerung für 4 Stunden bei RT in Lösung 2 (50 Teile N-Propanol, 40 Teil Nitromethan, 30 Teile MilliQ-Wasser). Wiederum wurde die Platte für 1 Stunde bei RT getrocknet und für 5 Minuten bei 110° C erhitzt. Im Anschluss wurden 50 mg Orcinol in 25 ml 20 % H₂SO₂ gelöst und die Platte unter dem Abzug mit Hilfe eines elektrischen Feinzerstäubers damit besprüht. Schließlich wurden die Oligosaccharide durch Schwärzung für 10 Minuten bei 110° C sichtbar gemacht.

2.2.2.9. HPLC-Analyse

Zur Quantifizierung der mannosehaltigen Oligosaccharide in den Gewebeproben wurde ein Teil der Zuckerextraktionen (2.2.2.7) mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) von Jean Claude Michalski und Willy Morelle in Lille quantitativ ausgewertet (weitere Informationen siehe Blanz u. a., 2008).

2.2.2.10. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Für den Nachweis der Immunreaktion auf appliziertes rhLAMAN in Form von Antikörperbildung wurden ELISAs durchgeführt. Hierfür wurden zunächst 96-*well* Platten mit je 0,2 µg des Antigens rhLAMAN pro *well* beschichtet und diese für 5 Stunden bei RT bzw. 16 Stunden bei 4° C mit Parafilm überzogen gelagert, um eine ausreichende Antigen-Beschichtung zu gewährleisten. Im Anschluss wurden die Platten dreimal 5 Minuten mit je 100 µl Waschpuffer (PBS plus 0,05 % Tween) pro *well* gewaschen, wobei die Platten stets kräftig zwischen diesen und allen folgenden Waschschritten ausgeschlagen wurden. Eine Blockierung erfolgte anschließend über Nacht bei 4° C mit je 100 µl 3 % BSA in PBS pro *well*. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal 5 Minuten mit je 100 µl Waschpuffer pro *well* gewaschen und anschließend für 2 Stunden bei 37° C mit je 100 µl Serumproben (1:500 verdünnt in PBS) pro *well* inkubiert. Nach drei weiteren Waschgängen für je 5 Minuten mit jeweils 75 µl Waschpuffer pro *well* erfolgte eine 1-stündige Inkubation bei RT mit je 100 µl HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper (sheep anti ms, 1:2000 in PBS verdünnt) pro *well*. Die Platten wurden dreimal mit je 75 µl Waschpuffer und dreimal mit je 75 µl reinem PBS gewaschen. Im Anschluss wurde die Platten für 30 Minuten bei RT mit je 100 µl Peroxidase-Substratlösung ABTS pro *well* inkubiert, um anschließend die Extinktionswerte bei 405 nm mit dem Tecan ELISA Reader zu detektieren.

2.2.3 Mikroskopische Methoden

2.2.3.1. Vorbereitung der Organe zwecks immunhistologischer Untersuchung

Nach der Organentnahme gemäß 2.2.1.2 für immunhistologische Zwecke wurden die Organe bzw. Organteile in 15 ml Falconröhrchen mit 4 % PFA in 0,1 M PB pH 7,4 für mindestens 2 Stunden bei 4° C nachfixiert. Im Anschluss wurden die Gewebeproben dreimal mit PB gewaschen und für 16 Stunden in 30 % Succrose in 0,1 M PB bei 4° C gelagert. Zum Schneiden der Organe wurden diese am mit Trockeneis gekühlten Leica 2000R Sliding Microtome auf einem 5 % Succrose-Kissen (in 0,1 M PB) festgefroren. Es wurden in der Regel 40 µm dicke Schnitte durchgeführt. Diese wurden mit Hilfe eines Pinsels aufgenommen und in 12er- bzw. 24er-*well*-Platten, die jeweils mit 0,1 M PB plus 0,02 % Natriumazid befüllt wurden, bei 4° C gelagert.

2.2.3.2. Immunhistologie (IH)

Die angefertigten Schnitte der Organe (2.2.4.1) wurden im so genannten „*Free-floating Slide*“-Verfahren gefärbt. Die Schnitte wurden in 12er- bzw. 24er-*well*-Platten für 1-2 Stunden bei RT mit Blocklösung (0,2 % BSA/ 0,5 % Triton/ 4 % NGS) unter kontinuierlich leichtem Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindungen abzubinden. Im Anschluss wurde diese durch die Primärantikörper-Lösung ersetzt, die aus Primärantikörper entsprechend der vorgesehenen Verdünnung in Blocklösung bestand. Die Platten wurden mit Parafilm überzogen und mit geschlossenem Deckel für 16 Stunden bei RT unter kontinuierlich leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte nach 3-fachem Waschen der Proben für je 10 Minuten mit Waschpuffer (0,1 M PB mit 0,25 % Triton) die Inkubation mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper, der entsprechend der vorgesehenen Verdünnung in Waschpuffer angesetzt wurde, für 2 Stunden bei RT unter kontinuierlich leichtem Schütteln. Nach zwei weiteren Waschgängen mit Waschpuffer wurden die Schnitte für 10 Minuten bei RT in Waschpuffer, der 1:1000 mit dem Kernfarbstoff DAPI versetzt wurde, inkubiert und zuletzt noch einmal gewaschen. Zum Abschluss wurden je drei Schnitte mittels eines Pinsels in deionisiertem Wasser auf einen Objektträger aufgezogen, mit einem Tropfen Fluoromount bestückt und eingedeckt. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt. Die Auswertung erfolgte mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Zeiss, Göttingen).

3. Ergebnisse

3.1. Zeitpunkt der Reakkumulation nach Reduktion der lysosomalen Ablagerungen nach Enzyersatztherapie (ERT)

Zur Festlegung eines Schemas zur Langzeitbehandlung von KO-Mäusen sollte zunächst geklärt werden, in welchem zeitlichen Intervall das Enzym injiziert werden muss, um langfristig eine Entspeicherung zu erzielen. Um festzustellen wann es nach erfolgreicher Reduktion der lysosomalen Ablagerungen von mannosehaltigen Oligosacchariden nach Enzyersatztherapie erneut zu einer Reakkumulation kommt, wurden in diesem Versuch behandelte Mäuse unterschiedlich viele Tage nach der letzten Enzymgabe perfundiert und deren Organe untersucht. Bisherige Analysen haben gezeigt, dass die Applikation von vier Mal 500 mU/mg KG zu einer massiven Reduktion des Speichermaterials in peripheren Geweben und im ZNS führen (Blanz u. a., 2008; Roces u. a., 2004).

Entsprechend wurde in diesem Versuch zehn KO-Mäusen in einem Abstand von je 3,5 Tagen diese Dosis von vier Mal 500 mU/mg KG an rhLAMAN injiziert. Im Anschluss wurde jeweils nach jeder Injektion eine Blutprobe entnommen, um sowohl die erfolgreiche Injektionsdurchführung als auch die Immunreaktion der Mäuse auf rhLAMAN zu überprüfen. Zwei der behandelten Mäuse verstarben kurz nach der letzten Injektion. Die übrigen acht wurden in drei Gruppen aufgeteilt, wobei die Organe von je zwei Mäusen 4 Tage (KO-4d), 8 Tage (KO-8d) bzw. 12 Tage (KO-12d) nach der letzten Enzymgabe entnommen und untersucht wurden und wiederum zwei KO-Mäuse zur histologischen Beurteilung 4 Tage bzw. 12 Tage nach der letzten Enzyminjektion perfundiert wurden. Kontrollen waren drei WT-Mäuse und drei mit PBS scheinbehandelte KO-Mäuse (KO*), von denen jeweils eine Maus für histologische Untersuchungen aufbereitet wurde. In diesem und den folgenden Versuchen werden als Repräsentant der peripheren Organe die Ergebnisse der Analysen der Milzproben und die der Gehirnprouben (ZNS) aufgeführt.

3.1.1 Enzymaktivitäten der α -Mannosidase nach ERT

Zunächst wurden α -Mannosidase Enzymassays (2.2.2.6) durchgeführt um zu überprüfen, wie lang nach der letzten Injektion die spezifische Aktivität von rhLAMAN nachgewiesen werden kann. Hierbei wurde in den meisten untersuchten Organproben der KO-4d-Mäuse ein moderater Anstieg der Enzymaktivität im Vergleich zu

denen der unbehandelten KO*-Mäusen detektiert. In den Milzproben wurde im Mittel eine spezifische Aktivität von 0,03 mU/mg (KO*(n=2): 0,005 mU/mg) und in den Gehirnprouben von 0,004 mU/mg (KO*(n=2): 0,002 mU/mg) (Abb.3.1) gemessen.

Mit Zunahme des Zeitintervalls zwischen der letzten Injektion und der Organentnahme wurden die Werte der spezifischen Aktivität und damit der funktionsfähigen Menge an α -Mannosidase in den peripheren Organen kontinuierlich geringer (Abb.3.1_A). Die Messergebnisse der Gehirnprouben ergaben gleich hohe Detektionswerte von 0,0023 mU/mg Enzymaktivität sowohl 8 Tage (n=2) als auch 12 Tage (n=2) nach der letzten Injektion (Abb.3.1_B). Mit dem Abfall der spezifischen Aktivität der α -Mannosidase und damit deren intrazelluläre Enzymkonzentration steigt die Wahrscheinlichkeit der Reakkumulation von mannosehaltigen Oligosacchariden an.

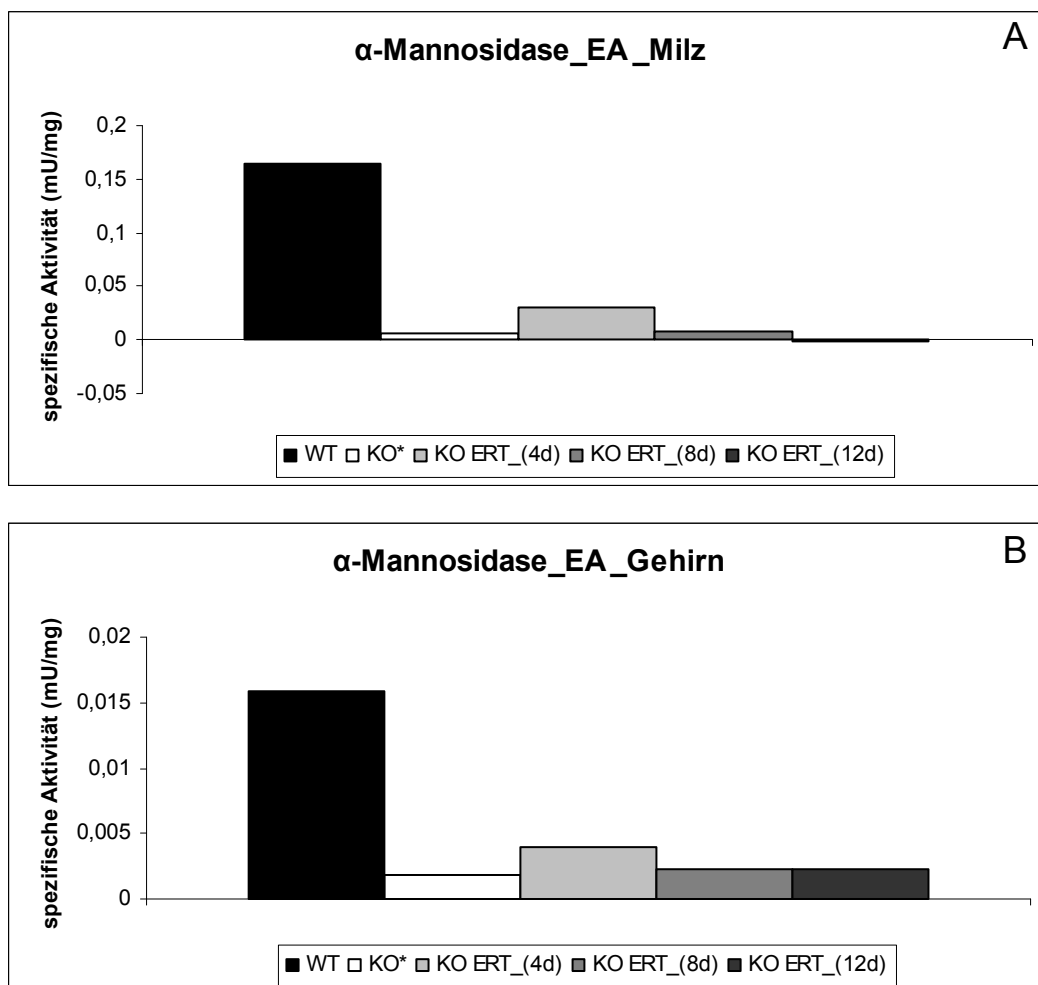


Abb. 3.1: Spezifische Enzymaktivitäten der α -Mannosidase 4, 8 und 12 Tage nach ERT (2.2.2.6), abgebildet sind die Messwerte von Milz (A) und Gehirn (B) von WT- und KO*-Mäusen sowie KO-Mäusen, deren Organe 4, 8 bzw. 12 Tage nach der letzten Injektion analysiert wurden. Inkubationszeiten: 4 Stunden (A) bzw. 18 Stunden (B).

3.1.2 Beurteilung der Oligosaccharidablagerungen nach ERT

Aus den Gewebeproben wurden zusätzlich Zuckerextraktionen hergestellt (2.2.2.7), durch die im Folgenden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie die mannosehaltigen Speichermaterialablagerungen in den Geweben beurteilt werden konnten (2.2.2.8). Die Oligosaccharide wurden chromatographisch aufgrund unterschiedlich stark wirkender Wechselwirkungen und damit Wanderungsgeschwindigkeiten in solche mit zwei bis neun Mannose-Resten aufgetrennt, die sich als Banden M2 bis M9 darstellen. In Abb. 3.2 ist die Dünnschichtchromatographie der Milzproben (A) als Repräsentant der peripheren Organe und die der Gehirnproben (B) abgebildet.

Bei der visuellen Betrachtung der Dünnschichtchromatographie der Milzproben konnten zunächst deutlich geringer gefärbte Banden in KO-4d-Proben im Vergleich zu den KO*-Proben erkannt werden, die allerdings nicht auf das Niveau der WT-Proben abnahmen. Zudem war von der Detektion der KO-4d-Proben ausgehend eine leichte Zunahme der Bandenintensität in den KO-8d-Proben und wiederum eine weitere leichte Zunahme in den KO-12d-Proben zu beobachten. Die Intensität der Anfärbung in den Proben der KO-12d-Mäuse erreichte nicht die der Extrakte der KO*-Mäuse. In der visuellen Analyse der Dünnschichtchromatographie der Gehirnproben wurden ebenfalls vermindert intensiv angefärbte Banden bei den Proben der KO-4d im Vergleich zu denen der KO*-Mäuse beobachtet. Die Färbung der Banden einer Probe der KO-8d-Mäuse und beider Proben der KO-12d-Mäuse glichen optisch beinahe denen der unbehandelten KO-Mäuse (KO*) (Abb. 3.2_B).

Bei der quantitativen Auswertung der Zuckerextrakte mit Hilfe der HPLC-Analyse wurden die Konzentrationen (nmol) der einzelnen mannosehaltigen Oligosaccharide M2 bis M9 pro Organprobe (mg/µl) bestimmt (2.2.2.9). Diese Messung ergab in den Milzproben der mit rhLAMAN behandelten KO-Mäuse wie bereits die TLC-Analytik eine massive Reduktion der Zucker 4 Tage nach der letzten Enzyminjektion um 74 % auf 26 % der gemessenen Ausgangskonzentration der unbehandelten KO*-Mäuse. Zudem wurde eine leichte Zunahme der krankheitstypischen Oligosaccharide 8 bzw. 12 Tage nach der letzten Enzymgabe gemessen, wobei die Ausgangskonzentration der KO*-Mäuse nach 12 Tagen (46 % der KO*-Ausgangswerte) nicht erreicht wurden (Abb. 3.3_A). Die quantitative Auswertung der mannosehaltigen Oligosaccharide der Gehirnproben bestätigte ebenfalls die partielle Entspeicherung der Gehirne. In den Proben der KO-Mäuse reduzierte sich die Konzentration der mannosehaltigen Oligosaccharide 4 Tagen nach der letzten Enzymgabe auf 27 % der gemessenen

Ausgangswerte der unbehandelten KO*-Mäuse. Zudem zeigte sich ein Wiederanstieg der Zuckerakkumulation im zeitlichen Verlauf auf. Die Werte erreichten ebenfalls nicht die der Ausgangskonzentrationen der unbehandelten KO*-Mäuse, wobei im Vergleich zur Auswertung der Zuckerextrakte der Milzproben (46 % der KO*-Ausgangswerte nach 12 Tagen) in den Gehirnproben eine prozentual stärkere Reakkumulation des Speichermaterials verzeichnet wurde (47 % der KO*-Ausgangswerte nach 8 Tagen, 67 % der KO*-Ausgangswerte nach 12 Tagen) (Abb. 3.3_B).

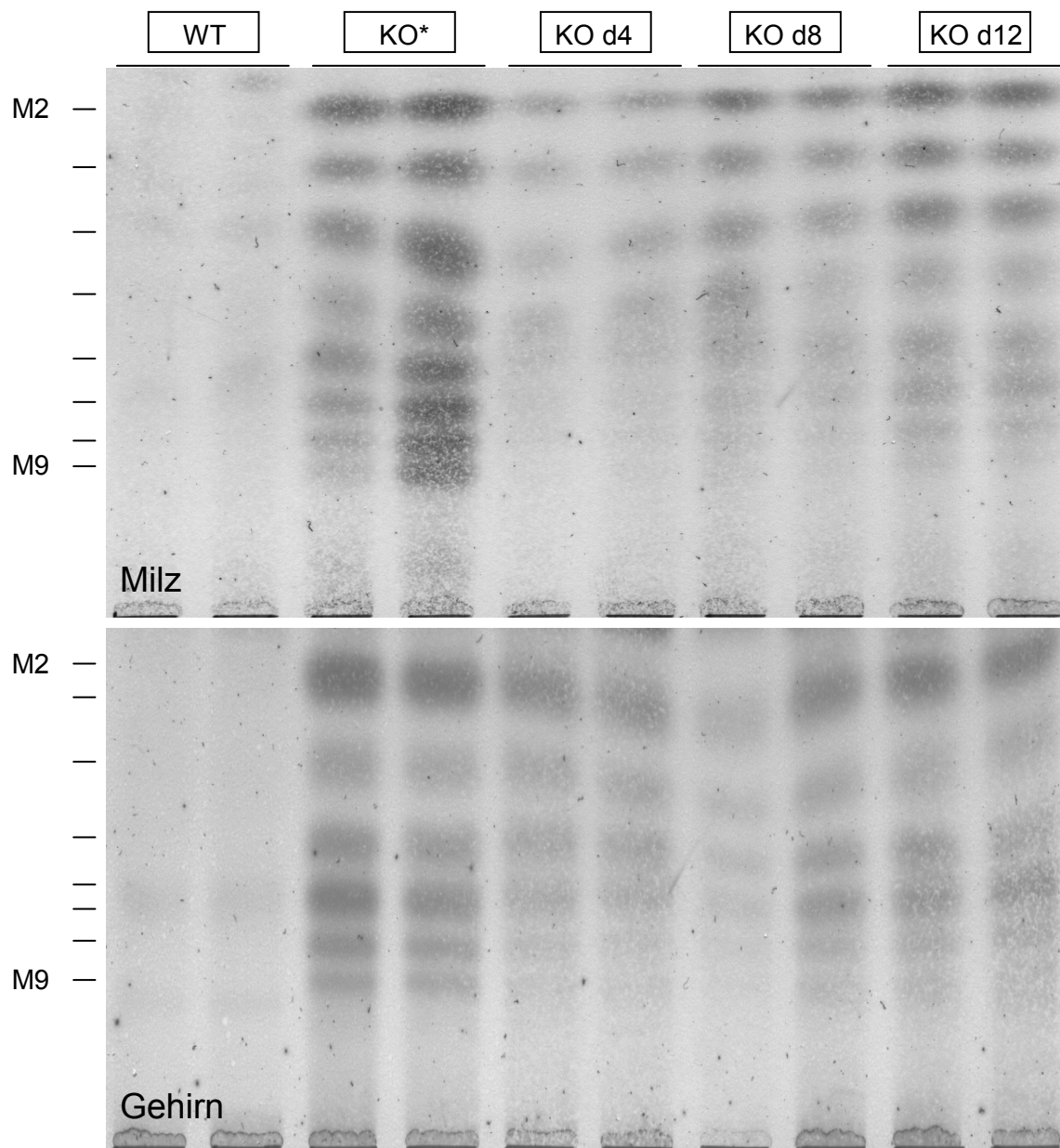


Abb. 3.2: Dünnschichtchromatographie 4, 8 und 12 Tage nach ERT (2.2.2.8), abgebildet sind Detektionsplatten von Milzproben (oben, je 10 µg Zuckerextraktion aufgetragen) und Gehirnproben (unten, je 20 µg Zuckerextraktion aufgetragen) von WT- und KO*-Mäusen sowie KO-Mäusen, deren Organe 4, 8 bzw. 12 Tage nach der letzten Injektion analysiert wurden. Das Bandenmuster zeigt chromatographisch aufgetrennte Oligosaccharide mit zwei bis neun Mannose-Resten (M2 bis M9).

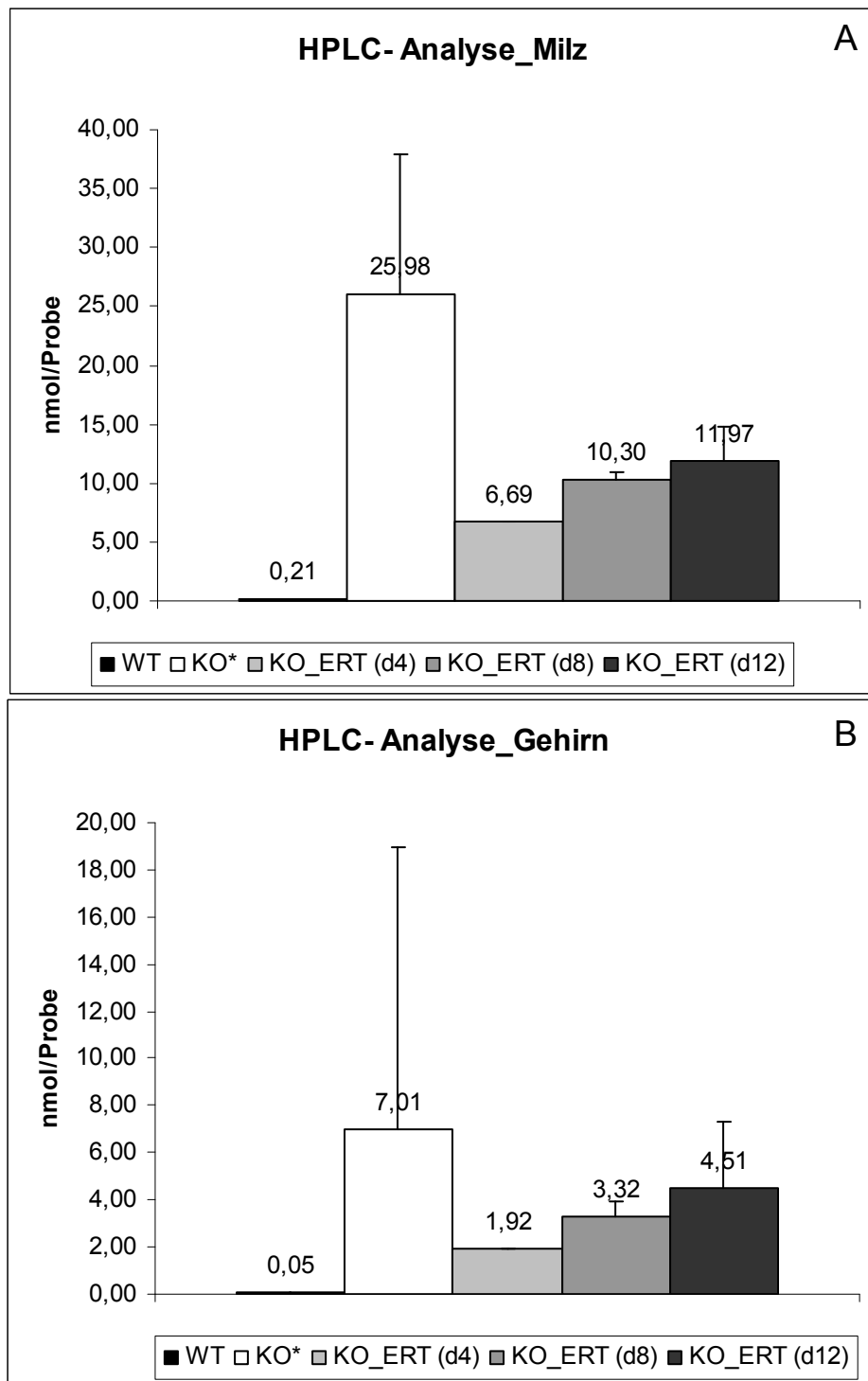


Abb. 3.3: Quantitative Analyse der Zuckerextraktionen 4, 8 und 12 Tage nach ERT. Ein Teil der Zuckerextraktionen (2.2.2.7) für die Dünnschichtchromatographien in Abb. 3.2 wurden von Jean Claude Michalski und Willy Morelle in Lille mittels HPLC-Analyse (2.2.2.9) quantitativ ausgewertet. Abgebildet sind jeweils die Konzentrationen der mannosehaltigen Oligosaccharide in Zuckerextraktionsproben von Milz (1mg/ μ l) und Gehirn (4 mg/ μ l).

Diese Untersuchungen ließen auf eine eindeutige Verminderung des Speicher-materials 4 Tage nach Enzyersatztherapie in den Milz- und Gehirnprouben mit einer Reduktion um fast drei Viertel der Zuckerablagerungen, sowie auf eine dann

folgende zunehmende Reakkumulation der Speicherglykane schließen, deren Menge nach 12 Tagen in den Milzproben mit unter 50 % und in den Gehirnprouben mit 64 % der Ausgangswerte jedoch zum Teil deutlich geringer war als zu Beginn der Therapie.

Als Vertreter des peripheren Nervensystems (PNS) wurden jeweils die Ganglien der Nervi Trigemini untersucht. Aufgrund der geringen Mengen an Material wurden für die Dünnschichtchromatographie die beiden Proben jeder Gruppe zusammengefügt (gepoolt). Im Vergleich zu den deutlich gefärbten Banden in den KO*-Proben wurde eine minimale Bandenanfärbung der Proben aller KO-Mäuse unabhängig des verstrichenen Zeitintervalls zwischen letzter Injektion und erfolgter Perfusion sichtbar (Abb. 3.4). Eine quantitative Auswertung des mannosehaltigen Speichermaterials mittels HPLC-Analyse war aufgrund der zu Verfügung stehenden, geringen Probenmengen nicht möglich.

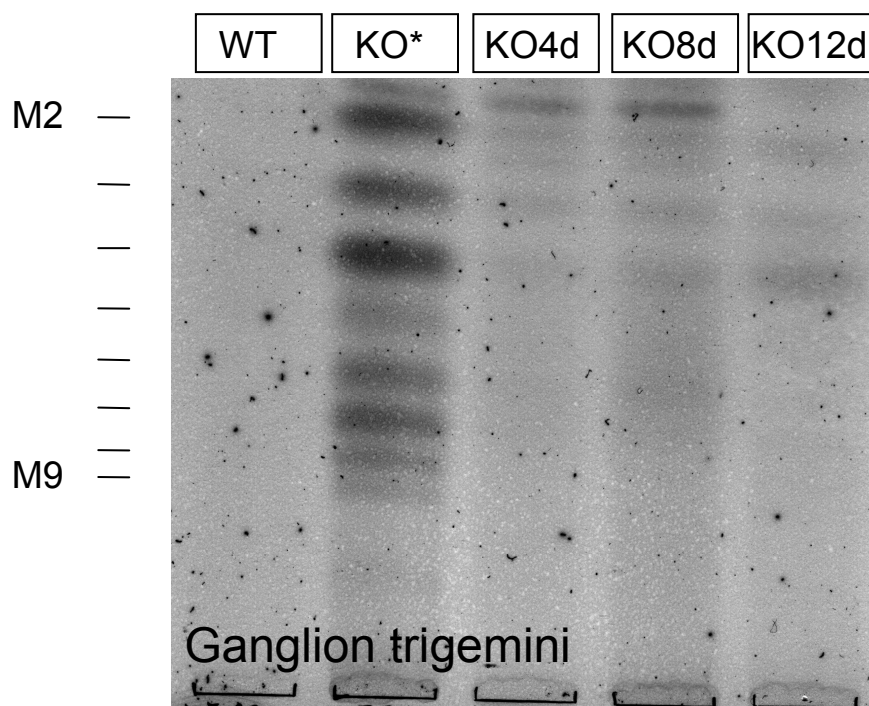


Abb. 3.4: Dünnschichtchromatographie 4, 8 und 12 Tage nach ERT (2.2.2.8), abgebildet sind Detektionsplatten von Proben der trigeminalen Ganglien (je komplette, gepoolte Zuckerextraktionsprobe aufgetragen) von WT- und KO*-Mäusen sowie KO-Mäusen, deren Organe 4, 8 bzw. 12 Tage nach der letzten Injektion analysiert wurden. Das Bandenmuster zeigt chromatographisch aufgetrennte Oligosaccharide mit zwei bis neun Mannose-Resten (M2 bis M9).

3.1.3 Histologische Analyse des ZNS und PNS nach ERT

Um die Effektivität der Enzyersatztherapie auch histologisch in Form der Reduktion von Anzahl und Größe der Speichervakuolen nachzuweisen, wurden nach Perfusion

der WT-, KO*- und der behandelten KO-Mäuse mit 6 % Glutaraldehyd, Lagerung in 3 % Glutaraldehyd, Nachfixierung mit 2 % Osmiumtetroxid und Einbettung in Araldit Semidünnschnitte von Teilen der Gehirne, hier der Hippocampi, und der trigeminalen Ganglien als Vertreter des PNS hergestellt. Diese wurden mit Toluidinblau gefärbt.

Bei der histologischen Analyse der Hippocampi waren in den Semidünnschnitten der mit vier Mal 500 mU/mg KG rhLAMAN behandelten KO-Maus 4 Tage nach der letzten Enzyminjektion keine Speichervakuolen erkennbar. Nach 12 Tagen zeigte sich indes wieder eine Ansammlung von Speichervakuolen, wobei deren Menge noch etwas geringer ausfiel als in den Schnitten der unbehandelten KO*-Maus (Abb. 3.5).

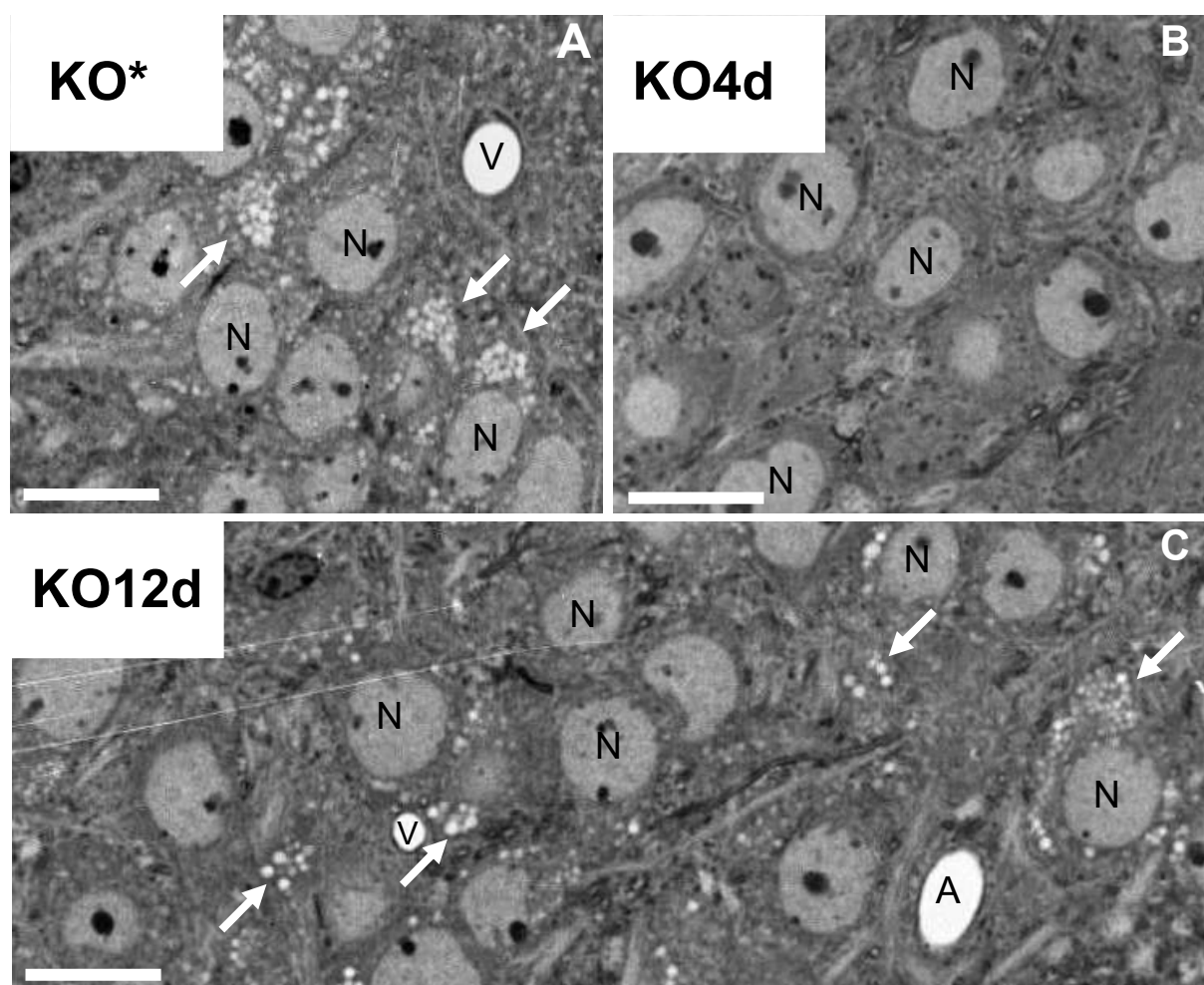


Abb. 3.5: Beurteilung des Speichermaterials im Zentralnervensystem nach ERT. Lichtmikroskopische Betrachtung des Hippocampus (CA3-Region) einer unbehandelten KO*-Maus (A) mit diversen Speichervakuolen (Pfeile), einer mit vier Mal 500 mU/mg KG rhLAMAN behandelten KO-Maus, die 4 Tage nach der letzten Injektion perfundiert wurde, ohne Speichervakuolen im Gewebe (B), sowie einer mit vier Mal 500 mU/mg KG rhLAMAN behandelten KO-Maus, die 12 Tage nach der letzten Injektion perfundiert wurde (C). Hier sind erneut Speichervakuolen (Pfeile) dargestellt (C). Maßeinheit 10 μ m. Semidünnschnitt (1 μ m), Toluidinblau, Aufnahmen R. Lüllmann-Rauch, Anatomisches Institut Kiel, A= Arteriole, N= Nucleus (Zellkern), V= Venole.

Diese histologischen Auswertungen bestätigte die in der Dünnschichtchromatographie und der HPLC-Analyse detektierte partielle Entspeicherung des Gehirns 4 Tage nach der letzten Injektionen von vier Mal 500 mU/mg KG rhLAMAN sowie die zunehmende Reakkumulation des pathologischen Speichermaterials nach 12 Tagen. Auch das Ergebnis der Analyse des PNS (Abb. 3.4) konnten durch die histologischen Untersuchungen bestätigt werden. Nach Gabe von vier Mal 500 mU/mg KG rhLAMAN waren in den trigeminalen Ganglien keine Speichervakuolen erkennbar. Weder in Semidünnschnitten der behandelten KO-Maus, die 4 Tage nach der letzten Injektion perfundiert wurden, noch in den Präparaten der KO-Maus, deren letzte Enzymgabe 12 Tage zurücklag, waren Speichervakuolen sichtbar (Abb. 3.6).

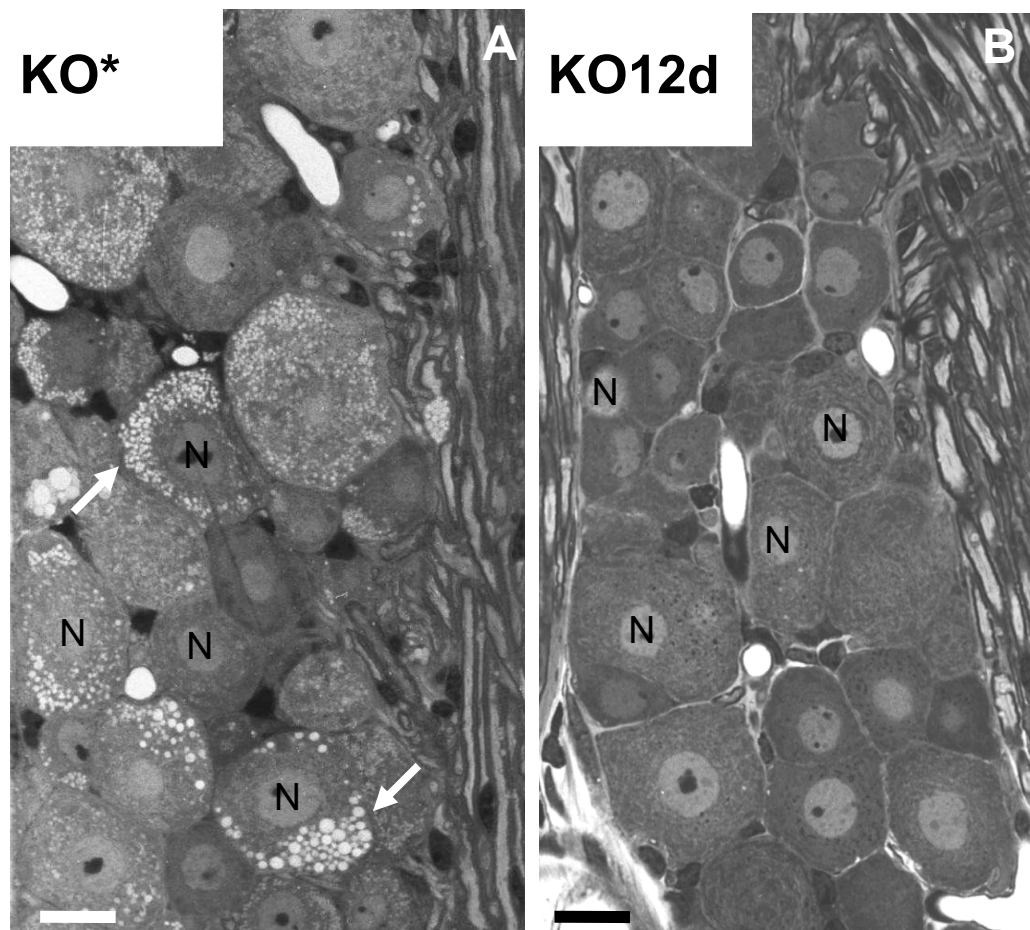


Abb. 3.6: Beurteilung des Speichermaterials im Peripheren Nervensystem nach ERT. Lichtmikroskopische Betrachtung des Ganglion trigeminale (Gasseri) einer unbehandelten KO*-Maus (A) mit diversen Speichervakuolen (Pfeile) und einer mit vier Mal 500 mU/mg KG rhLAMAN behandelten KO-Maus, die 12 Tage nach der letzten Injektion perfundiert wurde (B). Maßeinheit 10 μ m. Semidünnschnitt (1 μ m), Toluidinblau, Aufnahmen R. Lüllmann-Rauch, Anatomisches Institut Kiel, N = Nucleus (Zellkern).

3.1.4 Immunreaktion nach Applikation von 4 x 500 mU/mg KG rhLAMAN

Jeweils nach der intravenösen Gabe von PBS (KO*) und rhLAMAN (KO) wurden den Versuchstieren Blutproben entnommen. In diesen wurde sowohl die Enzymaktivität der α -Mannosidase bestimmt, um den Erfolg der Injektion zu verifizieren (2.2.2.6), als auch die Antikörperbildung spezifisch gegen das injizierte, artfremde rhLAMAN nachgewiesen. Hierfür wurden ELISAs, antikörperbasierte Nachweisverfahren durchgeführt, an deren Ende mit Hilfe einer enzymatischen Farbreaktion die Konzentration eines Antigens, in diesem Falle die Konzentration der anti-rhLAMAN-Antikörper, detektiert werden kann (2.2.2.9). Bei dieser Methode wird in mehreren Schritten das Antigen an unterschiedlichen Epitopen von zwei Antikörpern gebunden. Da der zweite Antikörper selbst an eine Peroxidase gekoppelt ist, kann nach Zufuhr des chromogenen Substrats der Peroxidase die Konzentration der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe gemessen werden, indem die Intensität der enzymatischen Farbreaktion, begründet durch die Menge an entstehendem Reaktionsprodukt, detektiert wird. Diese Extinktionsveränderungen stellt entsprechend die Menge an Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexen und damit die Antigenkonzentration dar.

Die behandelten KO-Mäuse zeigten alle einen Anstieg der IgG-Antikörperkonzentration gegen rhLAMAN. In den Blutproben der behandelten KO-Mäuse, die nach der dritten Injektion gewonnen wurden, also der Immunreaktion nach der zweiten Injektion entsprechen, konnten im Durchschnitt 5,5-fach erhöhte Extinktionswerte im Vergleich zu den Werten der unbehandelten KO*-Mäuse gemessen werden. Beim Vergleich der Blutproben nach der vierten Injektion (immunologisch nach der dritten) wurde in den Proben der KO-Mäuse im Mittel ein 19-fach stärkeres Signal im Verhältnis zu den Proben der unbehandelten KO*-Mäuse erfasst (Abb. 3.7). Damit wurde ein deutlicher Anstieg von Antikörpern gegen rhLAMAN sieben Tage nach der ersten Applikation des humanen Enzyms und ein massives Auftreten der Antikörper 10,5 Tage nach der ersten Injektion nachgewiesen.

In dieser Versuchsreihe konnte erneut nachgewiesen werden, dass durch die Injektion von vier Mal 500 mU/mg KG rhLAMAN eine deutliche Reduktion der Ablagerung von Speichermaterial im Gehirn von α -Mannosidase KO-Mäusen erreicht wurde (Abb. 3.5). Dies implizierte die Aufnahme von appliziertem rhLAMAN über die Bluthirnschranke ins Gehirn. Neben der partiellen Entspeicherung im ZNS wurden zudem eine deutliche Entspeicherung in den peripheren Geweben und eine vollständige Entspeicherung im PNS beobachtet. Zusätzlich konnte eine im zeitlichen

Verlauf zunehmende Reakkumulation der mannosehaltigen Oligosaccharide in allen untersuchten Geweben mit Ausnahme des PNS detektiert werden, die 12 Tage nach der letzten Enzymgabe nicht die KO*-Ausgangswerte erreichte (Milz: unter 50 %, Gehirn: 64 % der KO*-Ausgangswerte) und somit 12 Tage nach letzter Injektion noch nicht die Stoffwechsellage vor der Therapie vorlag (3.1.1 und 3.1.2). Bei dem folgenden Langzeitexperiment wurde daher ein 14-tägiges Injektionsintervall gewählt.

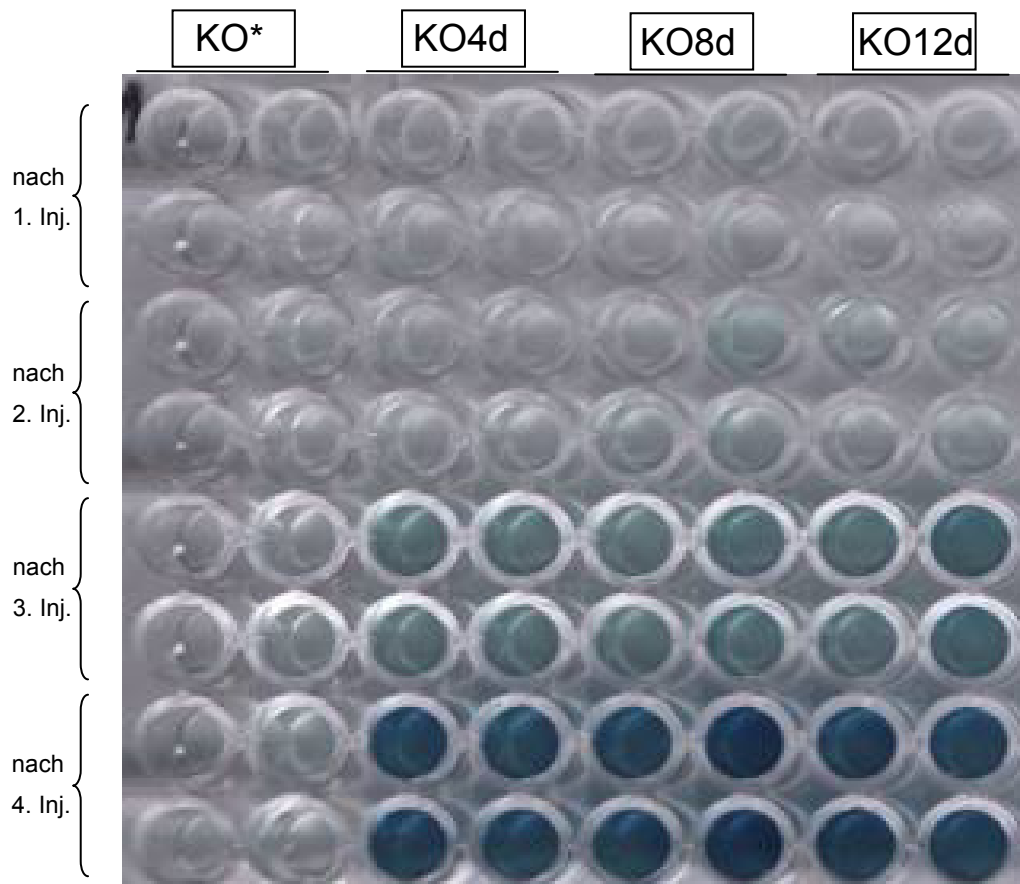


Abb. 3.7: Nachweis der Antikörperbildung gegen rhLAMAN mittels ELISA (2.2.2.10) 4, 8 und 12 Tage nach ERT. Abgebildet ist die mit Proben bestückte 96-well-Platte. Die zunehmende Farbintensität entspricht einer erhöhten Antikörperkonzentration gegen rhLAMAN, da diese zunächst einen HRP-gekoppelten Zweitantikörper binden, deren Peroxidase dann das zugefügte Substrat (ABTS) verstoffwechselt, was wiederum mit einer Farbreaktion einhergeht. Die Detektion erfolgt bei 405 nm. Inj. = Injektion.

3.2. Enzymsubstitution über 112 Tage – Langzeitexperiment

In diesem Langzeitexperiment sollte aufgrund der aufgetretenen Antikörperbildung gegen rhLAMAN im Vorversuch sowohl die Verträglichkeit als auch die Effektivität der Therapie mit rhLAMAN in verschiedenen Dosen in einem Modell überprüft werden, das am ehesten einer tatsächlichen Therapieform für den menschlichen Patienten nahe kommt. In einem 14-tägigen Injektionsintervall wurden deshalb je

sieben KO-Mäuse mit 25 mU/mg KG bzw. 500 mU/mg KG rhLAMAN behandelt. Zur Kontrolle wurden fünf KO-Mäuse mittels PBS scheinbehandelt (KO*). Jeweils vor den Injektionen wurden Blutproben zur Analyse der Immunreaktion entnommen. Für den Nachweis der Immunreaktion auf appliziertes rhLAMAN in Form von Antikörperbildung gegen das injizierte Enzym wurden ELISAs durchgeführt. Aufgrund der hohen Letalität musste der Versuch nach 16 Wochen abgebrochen werden. Nach acht Injektionen überlebten drei KO-Mäuse, die mit 25 mU/mg KG rhLAMAN, und zwei KO-Mäuse, die mit 500 mU/mg KG rhLAMAN pro Injektion behandelt wurden. Es lag eine Gesamtsterberate von 58 % bzw. 72 % vor (Abb. 3.8).

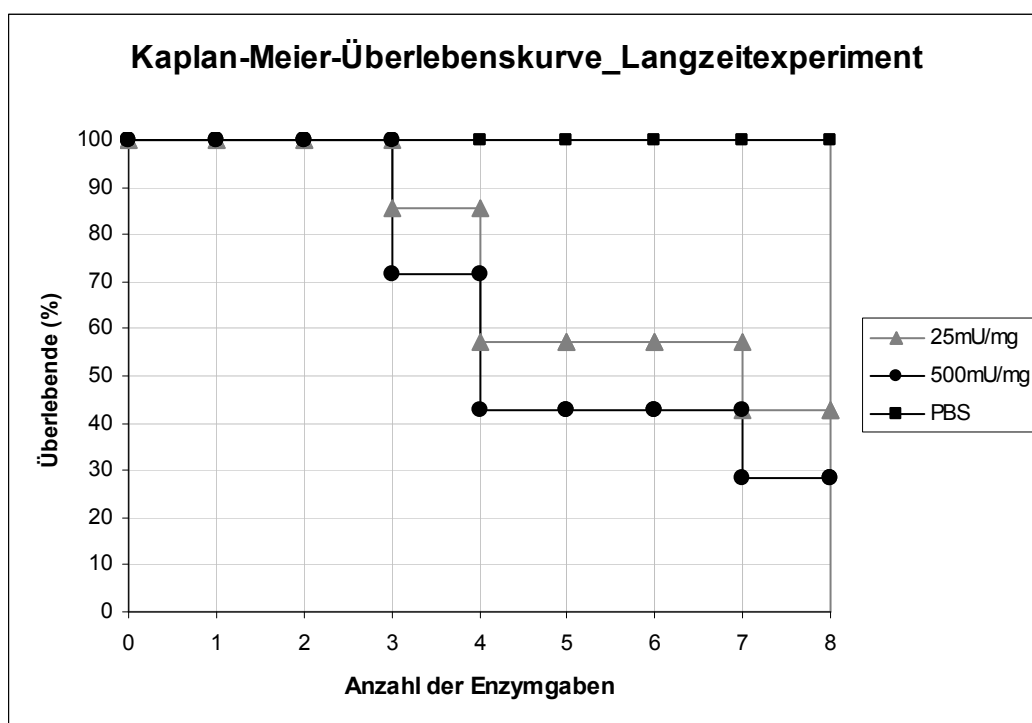


Abb. 3.8: Kaplan-Meier-Überlebenskurve. Auf der Ordinate sind die Überlebenden in Prozent, auf der Abszisse die Anzahl der Enzymgaben (Zeit) angegeben. Die Graphen zeigen die Entwicklung der Überlebenden in Prozent in Abhängigkeit von der Anzahl der Enzymgaben von den KO-Mäusen, die mit 25 mU/mg KG (Dreieck) und 500 mU/mg KG (Kreis) rhLAMAN behandelt wurden, sowie die mit PBS scheinbehandelten KO*-Mäuse (Quadrat).

3.2.1 Immunologische Auswertung des Langzeitexperiments

In der visuellen Auswertung des zur Erfassung der Immunreaktion der Mäuse durchgeführten ELISAs (2.2.2.10) war ein deutlicher Anstieg der Färbung in den Proben zu beobachten, die mit den Seren aus der Blutentnahme vor der dritten (KO-Mäuse mit 25 mU/mg KG Enzym) bzw. vor der zweiten Injektion (KO-Mäuse mit 500 mU/mg KG Enzym) versetzt wurden.

Bei der statistischen Auswertung dieser Extinktionswerte wurde ein statistisch signifikanter Anstieg der Immunreaktion in der Gruppe der mit 25 mU/mg KG Enzym behandelten KO-Mäuse nach der zweiten Injektion (Abb.3.9_A) und in der Gruppe der KO-Mäuse, denen 500 mU/mg KG rhLAMAN appliziert wurde, nach der ersten Injektion (Abb. 3.9_B) gemessen. Bei Versuchen mit WT-Mäusen, denen das artfremde rhLAMAN injiziert wurde, konnten ebenfalls massive Extinktionsanstiege bei der Antikörperbestimmung mittels ELISA detektiert werden. Es wurde angenommen, dass diese massive Immunreaktion der Mäuse auf das artfremde Enzym die hohe Sterberate bei diesem Versuch begründet

3.2.2 Biochemische Auswertung des Langezeitexperiments

Im Rahmen der Analyse der Proteinlysate (2.2.2.1) der Milzproben und der Gehirnproun der langzeitbehandelten KO-Mäuse wurde bei der Detektion der spezifischen Aktivität von α -Mannosidase (2.2.2.6) eine dosisabhängige Steigerung der Enzymaktivität gemessen. In Milzproben von KO-Mäusen, die acht Mal 25 mU/mg KG rhLAMAN erhielten, wurden im Vergleich zu den Messungen der Proben der KO*-Mäuse etwas erhöhte Aktivitätswerte (KO*: 0,003 mU/mg (n=2), KO 25 mU: 0,005 mU/mg (n=3)), in Lysaten der mit acht Mal 500 mU/mg KG rhLAMAN behandelten KO-Mäuse wurden fast 100-fach erhöhte Werte der α -Mannosidase detektiert (KO 500 mU: 0,28 mU/mg (n=2)). Die Messergebnisse der Gehirnlvsate zeigten einen geringeren Anstieg der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der applizierten Dosis (KO*: 0,0005 mU/mg (n=2), KO 25 mU: 0,0007 mU/mg (n=3), KO 500 mU: 0,0008 mU/mg (n=2)), wobei eine deutliche Diskrepanz (Faktor 10) der spezifische Aktivität der α -Mannosidase in den beiden Proben der mit 500 mU/mg KG rhLAMAN behandelten KO-Mäuse vorlag (0,0015 bzw. 0,00014 mU/mg).

In der Untersuchung der Milz-Zuckerextraktionen mittels Dünnschichtchromatographie (2.2.2.7, 2.2.2.8) wurden in den Proben der KO-Mäuse, die insgesamt acht Injektionen von je 25 mU/mg KG rhLAMAN erhielten, geringere Bandenintensitäten detektiert und damit die Reduktion von mannosehaltigen Oligosaccharide gemessen. Nach Injektion von acht Mal 500 mU/mg KG rhLAMAN nahm die Bandenintensität und entsprechend das Vorhandensein von mannosehaltigem Speichermaterial beinahe auf Kontrollniveau (WT) ab (Abb. 3.10). Die Analyse der Gehirnproun mittels Dünnschichtchromatographie zeigte eine gleichmäßig intensive Anfärbung der mannosehaltigen Oligosaccharide in den unbehandelten KO*- und allen behan-

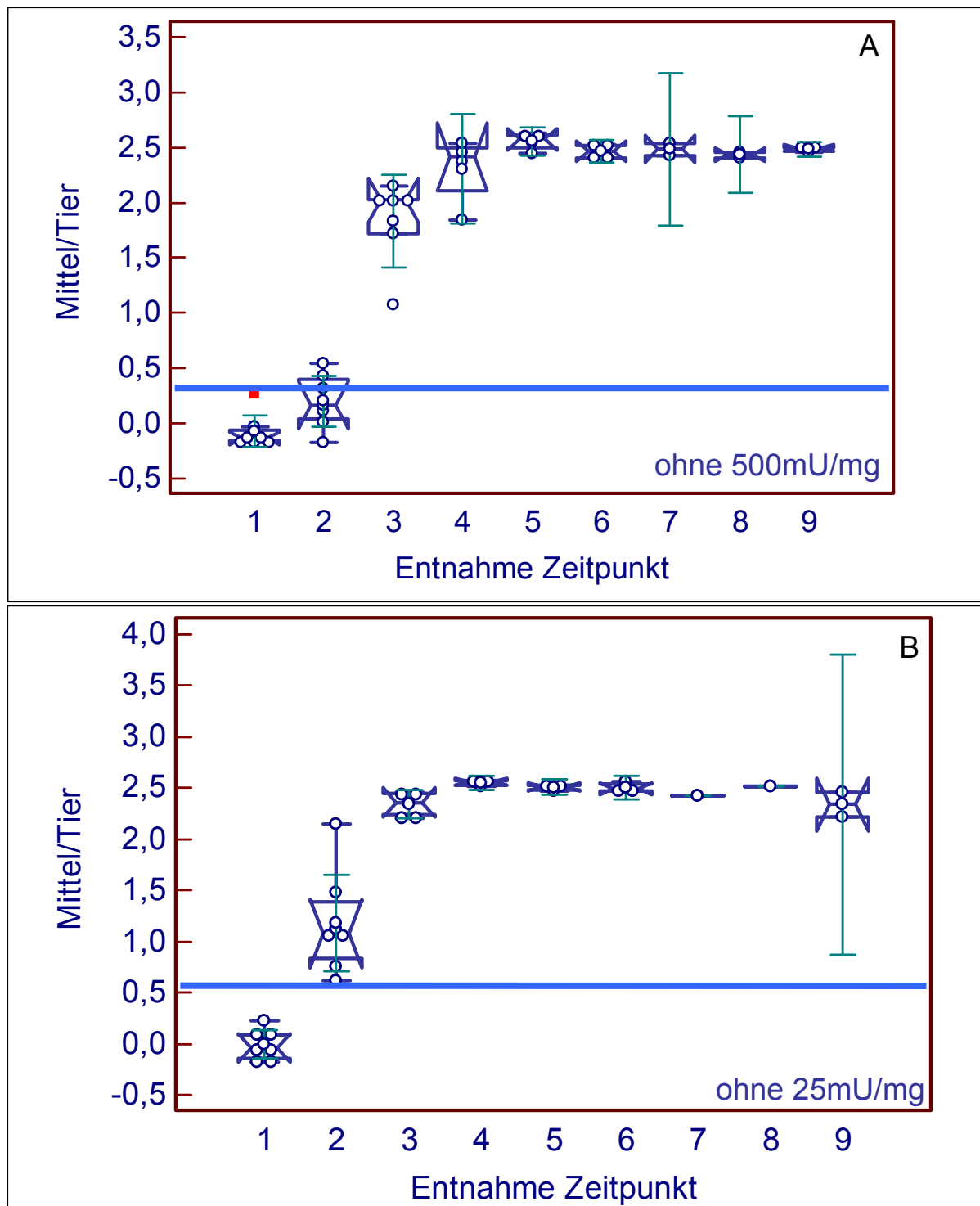


Abb. 3.9: Statistische Auswertung der Immunreaktion des Langzeitexperiments 3.2 mit ANOVA von Extinktionswerten, die zum Antikörpernachweis gegen rhLAMAN mittels ELISAs detektiert wurden. Dargestellt sind Box-and-Whisker-blots (error bars 95 % CI for mean) der Extinktionswerte der KO-Mäuse, die 25 mU/mg KG (A) bzw. 500 mU/mg KG Enzym erhielten (B). Auf der Ordinate werden die Mittelwerte der Extinktionswerte nach Abzug vom Leerwert pro Tier abgebildet, auf der Abszisse wird der Zeitpunkt der Entnahme (1= vor der 1. Injektion entspricht dem Ausgangswert, 9= vor der Perfusion entspricht der immunologischen Situation nach der 8. Injektion) abgebildet. Der auf beiden Abbildungen vorhandene Balken entspricht der Wertgrenze ab der ein statistisch signifikanter Anstieg an anti-rhLAMAN Antikörpern detektiert und entsprechend eine Immunreaktion gemessen wurde (Cut-off-Punkt (A) > 0,29 mit einer Sensibilität: 71,8 %, Spezifität: 95,2 % und AUC: 0,844; Cut-off-Punkt (B) > 0,6 mit einer Sensibilität: 78,1 %, Spezifität: 100 % und AUC: 0,888 via ROC curve).

delten KO-Mäusen (Abb. 3.10). Bei Einzeldosen von 500 mU/mg KG scheint ein Injektionsintervall von 14 Tagen zur Entspeicherung des ZNS von α -Mannosidase KO-Mäusen nicht effizient zu sein.

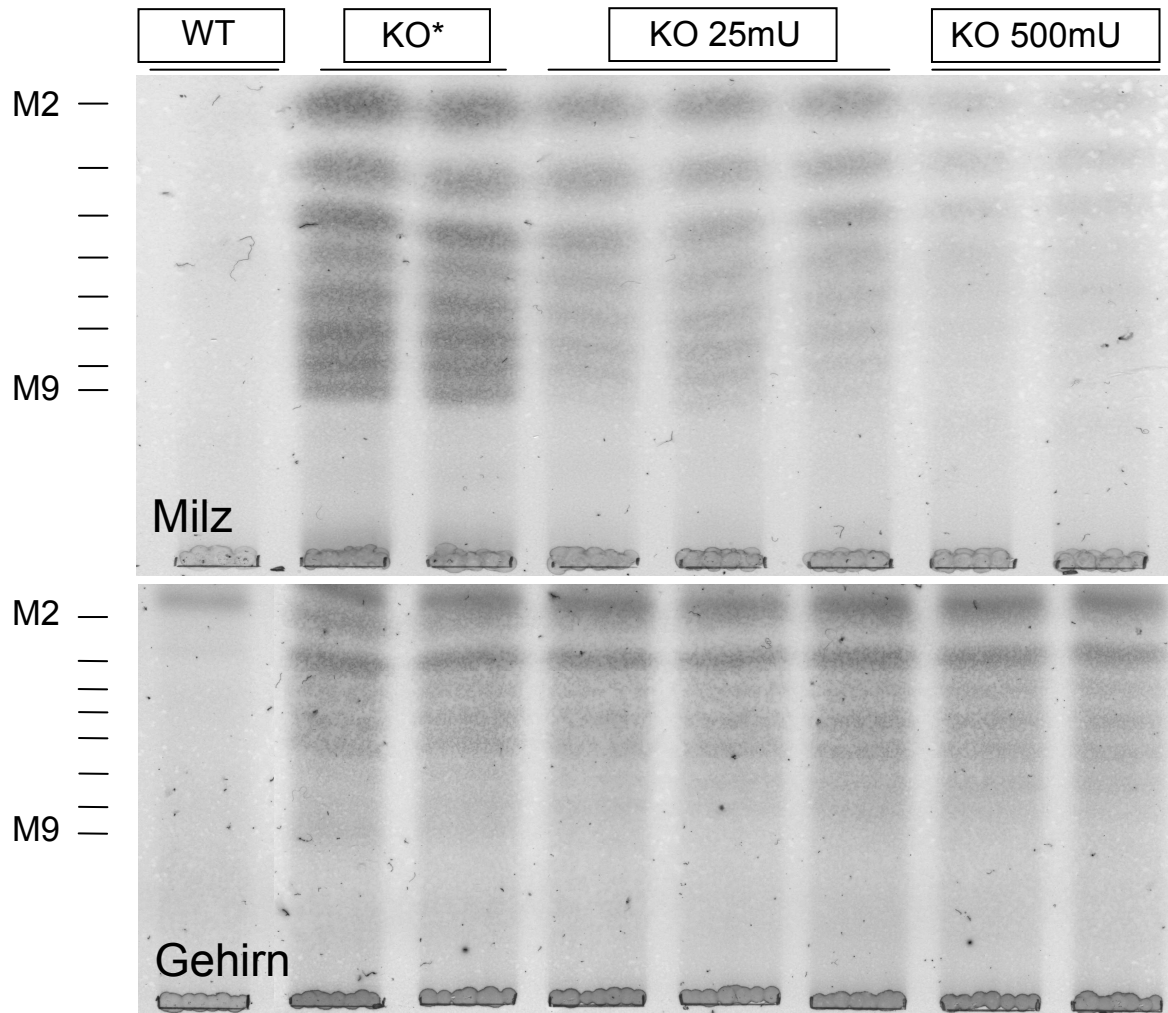


Abb. 3.10: Dünnschichtchromatographie-Auswertung des Langzeitexperiments (2.2.2.8), abgebildet sind Detektionsplatten von Milzproben (oben, je 10 μ g der Zuckerextraktion aufgetragen) und Gehirnproben (unten, je 20 μ g Zuckerextraktion aufgetragen) von WT- und KO*-Mäusen sowie KO-Mäusen, die acht Mal 25 mU/mg KG (KO 25mU) bzw. acht Mal 500 mU/mg KG (KO 500mU) intravenös appliziert bekamen. Das Bandenmuster zeigt chromatographisch aufgetrennte Oligosaccharide mit zwei bis neun Mannose-Resten (M2 bis M9).

3.3. Altersabhängige Enzymaufnahme ins Gehirn

In den vorherigen Versuchen wurde bestätigt, dass durch die Injektionen von mindestens vier Mal 500 mU/mg KG rhLAMAN eine deutliche Reduktion der Ablagerung von Speichermaterial im Gehirn erreicht werden konnte. Diese Ergebnisse implizierten die Aufnahme von rhLAMAN über die Bluthirnschranke ins Gehirn. Da die Integrität der Bluthirnschranke bei Jungtieren noch unvollständig ist und die physiologische Runterregulation der MPRs erst nach sieben bis acht

Lebenswochen stattgefunden haben soll (Urayama u. a., 2004), war es das Ziel dieses Experiments herauszufinden, ob die Aufnahme von rhLAMAN bei Jungtieren gesteigert ist.

Deshalb wurden Gewebeproben von sechs 8 Tage alten Mäusen (P8) und von jeweils fünf 21 Tage alten (P21) und fünf 3 Monate alten Mäusen (3Mo) untersucht. Jede Gruppe setzte sich aus zwei WT-Mäusen und drei bzw. vier (P8) KO-Mäusen zusammen. Um die Aufnahme von rhLAMAN zu ermitteln wurde je zwei KO-Mäusen einer Altersgruppe zwei Mal 500 mU/mg KG rhLAMAN im Abstand von 3,5 Tagen injiziert und je einer KO-Maus (in der P8 Gruppe zwei KO-Mäusen) als Scheinbehandlung von zwei Mal 100 µl PBS (KO*) verabreicht. Aufgeführt werden die Analysen der Gehirn- und Milzproben, wobei die Milz weiterhin die peripheren Organe repräsentiert.

3.3.1 Nachweis der α -Mannosidaseaktivität nach ERT

Die Messungen der spezifischen Aktivität der α -Mannosidase in den Gewebeproben (2.2.2.6) von Milz und Gehirn in den einzelnen Altersgruppen zeigten bis auf die Werte der Gehirne der P8-Mäuse ein ähnliches Bild. Es wurde eine verminderte Aktivität der α -Mannosidase in Proben der mit PBS behandelten KO*-Mäuse und die bisweilen deutliche Zunahme dieser nach Enzyersatztherapie gemessen.

Bei der Analyse der Enzymaktivität in den Milzen wurde in allen Altersgruppen das Fehlen bzw. eine massive Reduktion der α -Mannosidase in KO-Mäusen ohne Enzymsubstitution deutlich. Nach der Enzyersatztherapie überstiegen (3Mo und P21) bzw. erreichten (P8) die Enzymaktivitäten in allen behandelten KO-Mäuse die Werte der Kontrolltiere (WT) (Abb. 3.11).

Die Gehirnllysate der KO*-Mäuse wiesen im Verhältnis zu denen der WT-Mäuse eine deutliche Verminderung der α -Mannosidaseaktivität auf und hier zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der Enzymaktivität nach Enzyersatztherapie. Dieser erreichte in der Gruppe der 3 Monate alten Mäuse die Werte der WT-Mäuse und blieb in der Gruppe der 21 Tage alten Mäuse minimal geringer. Eine solche Zunahme der Aktivität der α -Mannosidase konnte in den Gehirnen der P8-KO-Mäuse nicht gemessen werden, vielmehr blieb die Enzymaktivität auf dem Niveau der unbehandelten KO*-Mäuse (Abb. 3.11). Trotz dieser Werte wurde auch in den 8 Tage alten KO-Mäusen (P8) von gelungenen Enzyminjektionen ausgegangen, da die Ergebnisse der Milzproben in dieser Gruppe ebenfalls einen Anstieg der spezifischen Aktivität der α -Mannosidase

in den Lysaten der behandelten KO-Mäuse beschrieben, wobei dieser als Hinweis auf die lediglich suboptimale Enzymapplikation nur auf das Enzymaktivitätsniveau der gleichaltrigen WT-Mäuse deutlich geringer ausfiel.

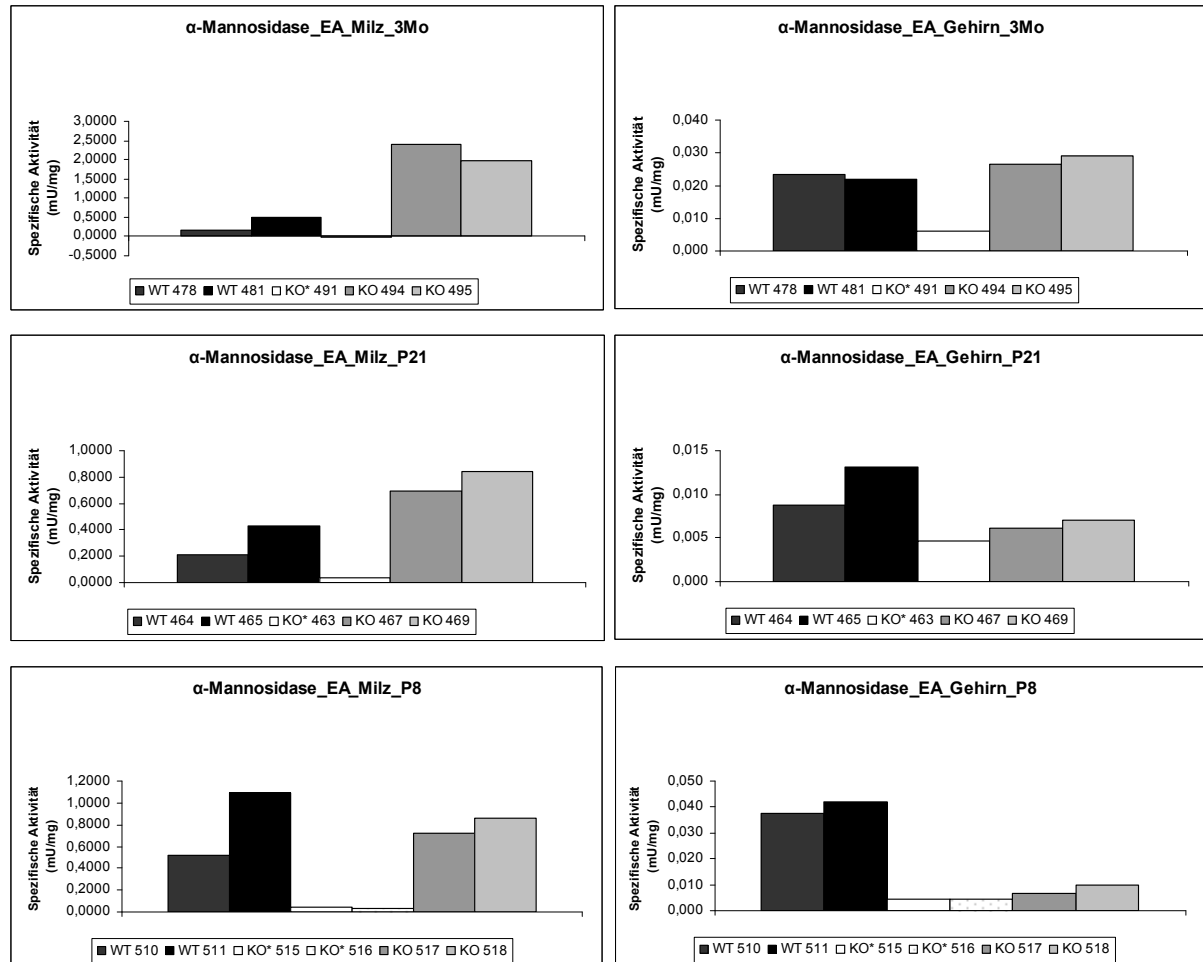


Abb. 3.11: Spezifische Enzymaktivitäten der α -Mannosidase nach ERT (2.2.2.6) in Milz- (rechts) und Gehirnprouben (links) von 3Mo-Mäusen (oben), P21-Mäusen (mitte) und P8-Mäusen (unten). Zur Kontrolle wurden Gehirne von WT-Mäusen und von unbehandelten KO*-Mäusen analysiert. Inkubationszeit: 5 bzw.17 Stunden.

3.3.2 Nachweis von rhLAMAN und LAMP1 in Geweben nach ERT

Um zunächst die Aufnahme des injizierten Enzyms rhLAMAN ins Gewebe zu beurteilen, wurden die Proteinlysate von Gehirn- und Milzgeweben mittels Western-blots (2.2.2.1 bis 2.2.2.5) mit einem Primärantikörper gegen rhLAMAN analysiert, wobei vor allem die Analyse der Gehirnllysate von großem Interesse war (Abb. 3.12). Das zu einem hohen Grad glykosylierte und gering phosphoylierte Enzym rhLAMAN wird als Präkursor (Vorläufer) mit einer Masse von 130 kDa synthetisiert und proteolytisch in drei Haupt-Glykoproteine mit 70, 42, 13/15 kDa gespalten, weitere Polypeptide mit den Massen 43-49, 39 und 20/22 kDa sind zudem teilweise

detektierbar (Nilssen u. a., 1997). Als Positivkontrolle wurde in COS-7-Zellen überexprimiertes rhLAMAN aufgetragen, welches nach Klonierung in den pcDNA3-Vektor durch Liposomen basierte Transfektion in COS-7-Zellen eingebracht wurde. PcDNA3 ist ein DNA-Vektor, der durch Klonierung von nur aus Exons bestehenden cDNA-Sequenzen zur Expression rekombinanter Proteine durch Säugetierzellen genutzt wird. Entsprechend sind bei der Detektion des überexprimierten rhLAMANS Banden des Präkursors und prozessierter Polypeptide zu erwarten. Als Ladekontrolle wurde Aktin mit einer Masse von 42 kDa detektiert.

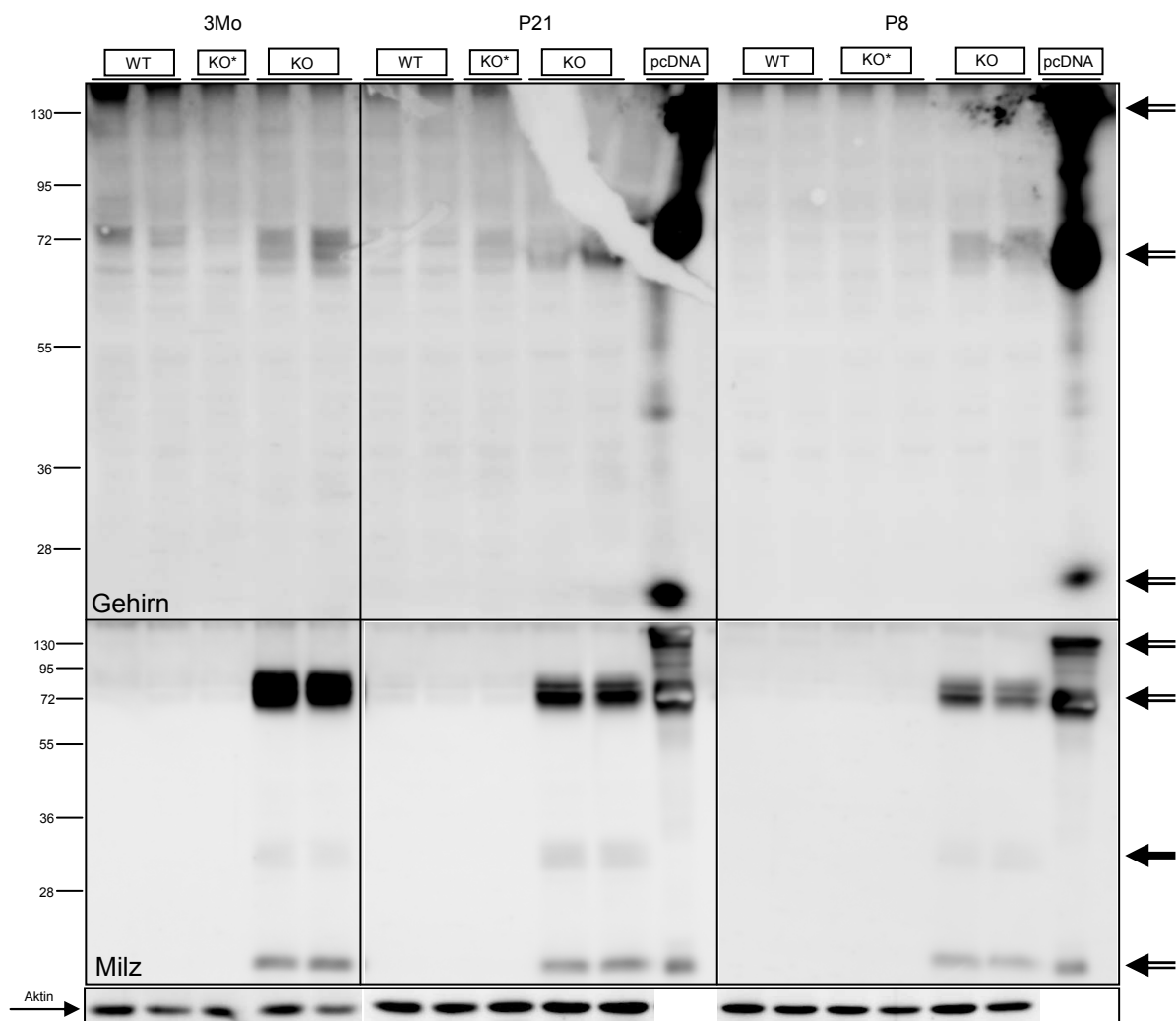


Abb. 3.12: Altersabhängige Westernblotanalyse von Gehirn- und Milzlysaten. Die Proteinlysate von Versuchstieren im Alter von 3 Monaten (3Mo) und 21 Tagen (P21) und 8 Tagen (P8) wurden hier untersucht. Je 60 µg Gesamtein der Gehirnpben (obere Reihe) wurde über 4-12 % NuPAGE-Gele und je 30 µg Gesamtein der Milzproben (untere Reihe) wurde über 12,5 % SDS-PAGE-Gele aufgetrennt und mit dem Antikörper Laman pab detektiert. 5 µl pcDNA von rhLAMAN wurde als Positivkontrolle detektiert, als Ladekontrolle wurde Aktin detektiert. (2.2.2.1 bis 2.2.2.5). Doppelpfeile: rhLAMAN Präkursor: 130 kDa, proteolytisch prozessierte Polypeptide bei ca. 70 kDa und ca. 20 kDa (nur in Milzproben), schwarzer Pfeil: partiell prozessierte Zwischenprodukte bei ca. 34 kDa (nur in Milzproben).

In den Proteinproben der Gehirne und Milzen von allen behandelten KO-Mäusen konnten Proteine mit einer Masse von 70 kDa nach anti-rhLAMMAN Färbung detektiert werden, wobei diese in den Milzproben stärker ausgeprägt waren als in den Homogenisaten der Gehirne. Im direkten Vergleich der Gehirnprouben zwischen 3 Monate (3Mo) und 21 Tage (P21), sowie 21 Tage (P21) und 8 Tage (P8) alten Mäuse konnten keine eindeutigen Unterschiede in der Intensität der Banden erkannt werden (Abb. 3.11 oben). In den Gewebelysaten der Milzen fielen zusätzliche Banden bei ca. 34 kDa und 20 kDa auf. Die erste Bande entspricht vermutlich einem partiell prozessierten Zwischenprodukt von rhLAMMAN, die zweite einer prozessierten Form von rhLAMMAN, da identische Banden nur mit einer Masse von 20 kDa bei der Positivkontrolle, dem überexprimierten rhLAMMAN detektiert wurden. (Abb. 3.12). Die Aufnahme von injiziertem rhLAMMAN in Gehirn und periphere Organe, sowie die proteolytische Aufspaltung des Enzyms in peripheren Organen konnte somit demonstriert werden.

Da lysosomalen Ablagerungen mit der Vergrößerung der Lysosomen und daraus resultierend mit der Erhöhung der Konzentration lysosomaler Membranproteine wie LAMP1 und LAMP2 einhergehen, werden diese Proteine bei Volumenzunahme der Lysosomen vermehrt exprimiert. Zur Untersuchung der Abnahme von Speicher-material und somit der Reduktion der Speichervakuolen bzw. des lysosomalen Volumens nach Enzymsubstitution wurde entsprechend das Protein LAMP1 (in peripheren Geweben 110 kDa, im Gehirn 80-90 kDa) als Marker detektiert (Abb. 3.13). Als Ladekontrolle wurde Aktin mit einer Masse von 42 kDa detektiert.

Die Gehirn- und Milzproben der α -Mannosidase KO*-Mäuse zeigten in allen untersuchten Altersstufen stets ein krankheitstypisches, zum Teil deutlich verstärktes Expressionssignal von LAMP1 als die zum Vergleich vorliegenden Proben der WT-Mäuse. Bei der LAMP1 Antikörperfärbung der Gehirnprouben wurde in Proben der 3 Monate alten Mäuse und der 21 Tage alten Mäuse ähnlich starke Bandenintensitäten in behandelten (KO) und unbehandelten (KO*) Mäusen detektiert. Im Vergleich der Gehirnprouben der Mäuse im Alter von 8 Tagen (P8) erschienen die LAMP1-Banden der KO-Mäuse nach Enzymsubstitution in Vergleich zu den KO*-Mäusen vermindert (Abb. 3.13 oben). Bei der Untersuchung der peripheren Organproben (Milz) konnte bei der anti-LAMP1 Färbung bei den mit Enzym substituierten KO-Mäusen eine Abschwächung des Signals von LAMP1 detektiert werden. Diese war abhängig von der betrachteten Altersgruppe unterschiedlich

ausgeprägt, aber in allen Altersstufen eindeutig erkennbar. Die Proben der P8-KO-Mäuse zeigten sogar schwächere Banden als die der WT-Mäuse gleichen Alters (Abb. 3.13 unten). Die Expression von LAMP1 wurde nach nur zwei Enzymsubstitutionen von je 500 mU/mg KG in peripheren Geweben in allen untersuchten Altersklassen, sowie zentralnervös in den Proben der 8 Tage alten KO-Mäuse reduziert.

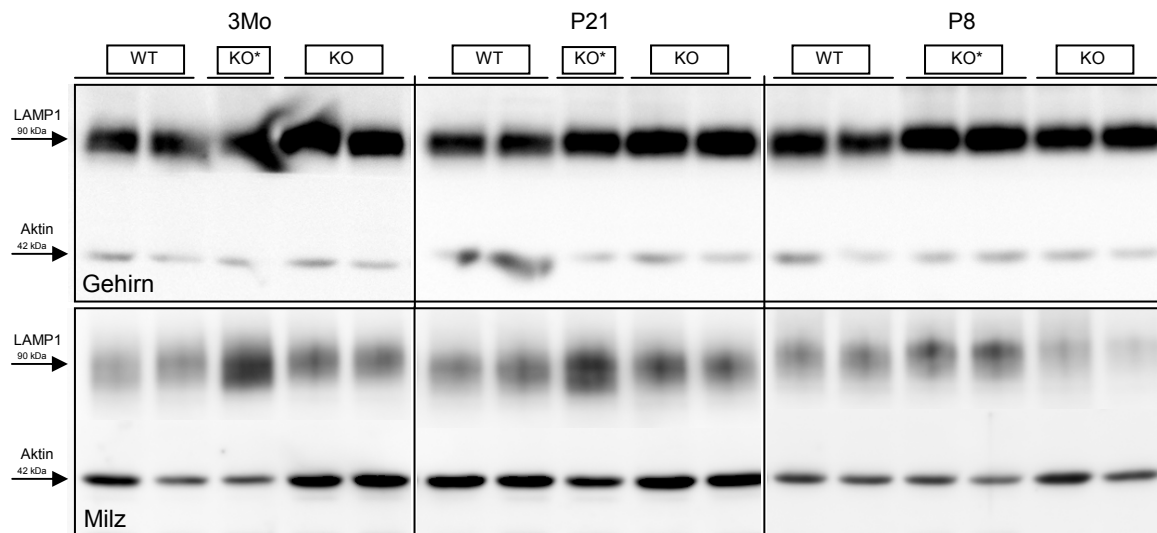


Abb. 3.13: Altersabhängige Westernblotanalyse von Gehirn- und Milzlysaten. Die Proteinlysate von Versuchstieren im Alter von 3 Monaten (3Mo) und 21 Tagen (P21) und 8 Tagen (P8) wurden hier untersucht. Je 45 µg Gesamtprotein der Gehirnproben (obere Reihe) bzw. je 30 µg Gesamtprotein der Milzproben (untere Reihe) wurde über 12,5 % SDS-PAGE-Gele aufgetrennt und mit den Antikörpern LAMP1_{rat} detektiert, als Ladekontrolle wurde Aktin detektiert (2.2.2.1 bis 2.2.2.5).

3.3.3 Nachweis der Oligosaccharidablagerungen nach ERT

Im Rahmen der Untersuchung der Gehirnproben konnte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (2.2.2.7, 2.2.2.8) die Ablagerung von mannosehaltigen Oligosacchariden in den Gehirnen der KO-Mäuse nachgewiesen werden.

Bei der visuellen Betrachtung der Dünnschichtplatten der 3 Monate alten Mäuse und der 21 Tage alten Mäuse erschien die Bandenintensität in den Proben der KO-Mäuse gegenüber denen der KO*-Mäuse reduziert. Die Signalstärke der Banden in den Proben der KO-Mäuse im Alter von 8 Tagen wirkte im Vergleich zu der der unbehandelten KO*-Mäuse etwas geringer (vor allem von M5 bis M9) (Abb. 3.14). Durch die Injektion von zwei Mal 500 mU/mg KG rhLAMAN wurde eine Reduktion der Konzentration an krankheitstypischem Speichermaterial in den 3 Monate alten und in den 21 Tage alten KO-Mäusen, sowie eine Reduktion der mannosehaltigen Oligosaccharide in den 8 Tage alten KO-Mäusen erreicht. Dieser Therapieeffekt

konnte zudem nur in den Gehirnproben der KO-Mäuse im Alter von 8 Tagen indirekt durch die Detektion der verminderten Expression von LAMP1 nach Enzymgabe bestätigt werden (s. 3.3.2, Abb. 3.13). Aufgrund der geringen Mengen an Probenmaterial war die Durchführung einer HPLC-Analyse zur quantitativen Auswertung der Konzentrationen der mannosehaltigen Oligosaccharide nicht möglich.

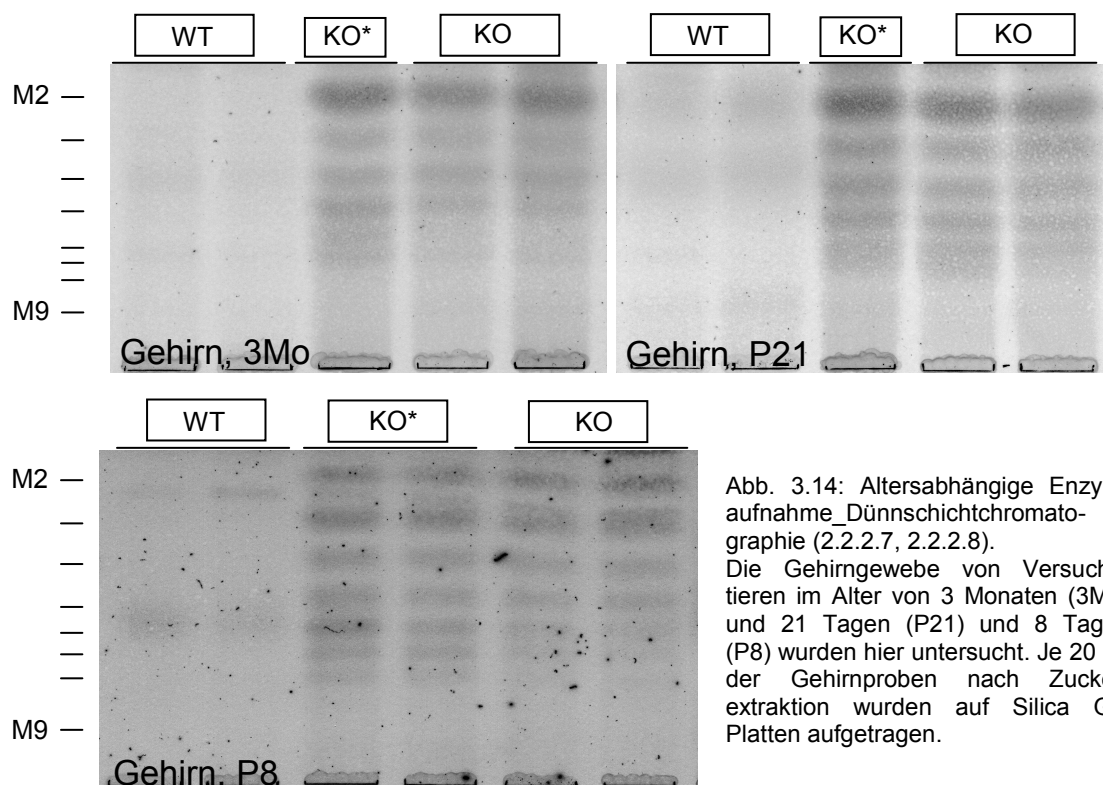


Abb. 3.14: Altersabhängige Enzymaufnahme_Dünnschichtchromatographie (2.2.2.7, 2.2.2.8). Die Gehirngewebe von Versuchstieren im Alter von 3 Monaten (3Mo) und 21 Tagen (P21) und 8 Tagen (P8) wurden hier untersucht. Je 20 µg der Gehirnproben nach Zuckerextraktion wurden auf Silica Gel Platten aufgetragen.

3.4. Endozytotische Aufnahme von rhLAMAN in vitro

In vorherigen Versuchen konnte durch den Nachweis der partiellen bzw. vollständigen Entspeicherung der Gewebe gezeigt werden, dass eine suffiziente Aufnahme des substituierten, lysosomalen Enzyms rhLAMAN in das Gehirn über die Bluthirnschranke nach Injektion von mindestens zwei Enzymdosen je 500 mU/mg KG stattfinden muss. In den peripheren Organen war eine Enzymapplikation ab 25 mU/mg KG ausreichend (Blanz u. a., 2008).

Da lysosomale Enzyme sowohl intrazellulär also auch bei der Endozytose von Mannose-6-Phosphat Rezeptoren (MPRs) gebunden und weiter zum Lysosom transportiert werden (Braulke & Bonifacio, 2009), war es Ziel dieser Versuchsreihe herauszufinden, ob auch die zelluläre Aufnahme von rhLAMAN MPR-abhängig

abläuft und entsprechend durch das Substrat der MPRs, das Mannose-6-Phosphat (M6P), geblockt werden kann. Es sind zwei MPRs unterschiedlicher Größe und Bindungseigenschaften, MPR46 und MPR300, beschrieben (s. 1.1) (Munier-Lehmann u. a., 1996). Viele Zelltypen tragen auf der Zelloberfläche MPR300-Moleküle und können so extrazellulär vorhandene lysosomale Enzyme M6P-abhängig endozytieren (Ghosh u. a., 2003). Für die Untersuchungen der MPR-abhängigen Aufnahme von rhLAMAN standen embryonale Mausfibroblasten (PS1 +/+ und verschiedene MPR-defiziente Zelllinien), sowie feline Nierenfibroblasten (COS-7), humane epithelartige Zellen eines Zervix-Karzinoms (Hela) und Ovar- und Nierenzellen von Hamstern (CHO, BHK) (s. 2.1.4) zur Verfügung (2.2.1.4. bis 2.2.1.8).

3.4.1 Aufnahme und Blockade der Aufnahme von rhLAMAN in unterschiedlichen Zelltypen

Zunächst sollte die Frage geklärt werden, ob die zelluläre rhLAMAN Aufnahme MPR-abhängig ist. Zu erwarten wäre dann, dass bei einer Blockade der MPRs mit deren Substrat M6P die Aufnahme des Enzyms massiv oder gänzlich verhindert sein würde und eine deutlich verminderte spezifische Aktivität der α -Mannosidase detektierbar wäre als in den Lysaten der Versuchszellen, die in Endozytosemedium mit rhLAMAN und ohne M6P-Block inkubiert wurden. Es wurden CHO-Zellen, Hela-Zellen, Cos7-Zellen und BHK-Zellen kultiviert (2.2.1.4), in drei verschiedenen Endozytosemedien inkubiert (2.2.1.7) und im Anschluss wurde die spezifische Aktivität der α -Mannosidase anhand von Enzymassays in diesen Zellen bestimmt (2.2.2.2, 2.2.2.6). Als Endozytosemedien kamen 1) normales Medium ohne Zusätze, 2) Medium mit 0,1 mg rhLAMAN und 3) Medium mit 0,1 mg rhLAMAN und 10 mM M6P zum Einsatz. In Abb. 3.15 sind die Ergebnisse dieser Enzymassays graphisch dargestellt.

In allen untersuchten Zelllinien (Fibroblasten und epithelartige Zellen) wurde die Zunahme der spezifischen Aktivität der α -Mannosidase und damit deren Aufnahme in die Zellen nach Inkubation in rhLAMAN-haltigem Endozytosemedium gemessen. Alle Zellen zeigten zudem eine eindeutige Reduktion der α -Mannosidaseaktivität nach Zugabe von M6P, wobei die Enzymaktivität in Hela- und in Cos7-Zellen gänzlich und in BHK-Zellen fast vollständig auf das Niveau der Kontrollzellen abnahm. In CHO-Zellen wurde nach Inkubation in rhLAMAN- und M6P-haltigem Medium eine Reduktion der Enzymaktivität um 50 % im Vergleich zur reinen Zugabe von

rhLAMAN detektiert. Wobei der gemessene Wert 300 % der α -Mannosidaseaktivität der CHO-Kontrollzellen ohne Enzymzufuhr ausmachte. Eine Endozytose unabhängig des an der Plasmamembran vorkommenden MPR300 war zu vermuten. Die erfolgreiche Blockade der Aufnahme von rhLAMAN durch das Substrat M6P der MPRs in Hela-, Cos7-Zellen und BHK-Zellen hingegen ließ eine MPR-abhängige Aufnahme der applizierten, lysosomalen α -Mannosidase erwarten. Um die tatsächlich endozytierte Menge an rhLAMAN zu erfassen wurde die Enzymaktivität in den Medien jeweils vor und nach Zugabe zu den einzelnen Zellen analysiert. Hierbei stellte sich heraus, dass lediglich ein sehr geringer Anteil von etwa 1 bis 2 % Enzym überhaupt von den Zellen aufgenommen und nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

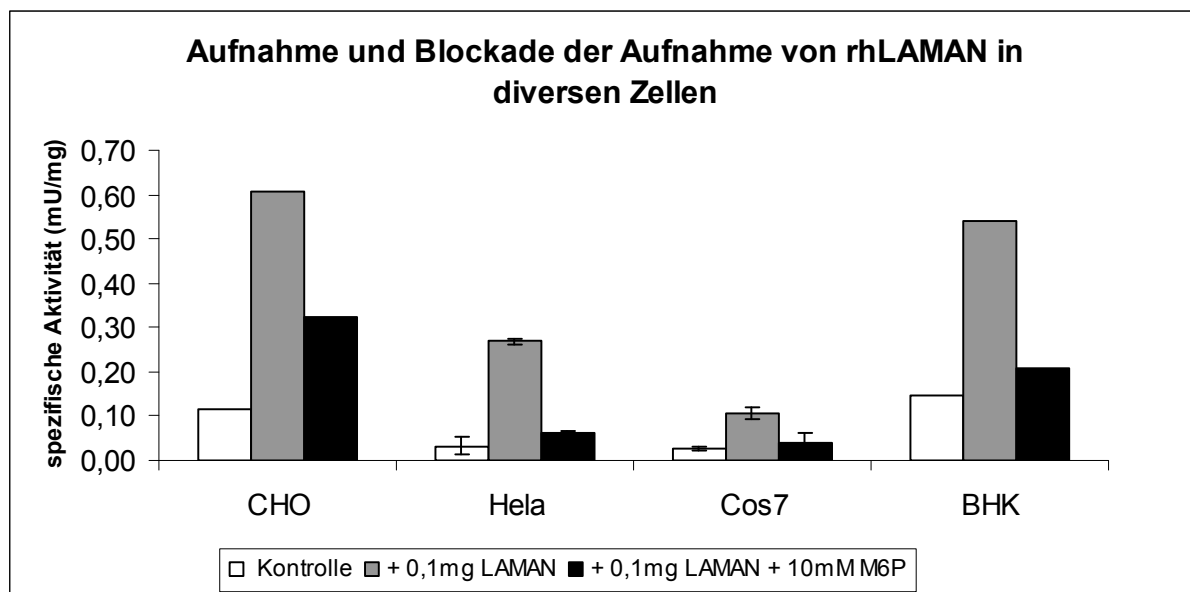


Abb. 3.15: Spezifische Enzymaktivitäten der α -Mannosidase (2.2.2.6) in CHO-, Hela-, Cos7- und BHK-Zellen nach 3 stündigem Endozytoseassay ohne Zusatz, mit 0,1 mg rhLAMAN bzw. mit 0,1 mg rhLAMAN und 10 mM M6P als Zusatz im Medium (2.2.1.7). Inkubationszeiten der Enzymassays: 16 bzw. 17 Stunden.

3.4.2 Aufnahme und Blockade der Aufnahme von rhLAMAN in MPR-defizienten Zellen

Bei diesem Versuch kamen embryonale Mausfibroblasten (PS1 +/+) als Kontrollzellen sowie MPR46-defiziente (MPR46KO), MPR300-defiziente (MPR300KO) und MPR-doppeldefiziente (MPR46/300_KO) Zellen, alle ebenfalls embryonale Fibroblasten der Maus, zum Einsatz, um die direkte Beteiligung der MPRs an der Endozytose der lysosomalen α -Mannosidase zu überprüfen. Es wurden Endozytose-

assays mit 1) normalem Medium, 2) Medium mit 0,1 mg rhLAMAN und 3) Medium mit 0,1 mg Enzym und 10 mM M6P zum Blockieren der MPRs durchgeführt.

Hierbei konnte in allen Zellen eine deutlich erhöhte α -Mannosidaseaktivität nach Inkubation in rhLAMAN-haltigem Medium gemessen werden und damit die zelluläre Aufnahme von rhLAMAN gezeigt werden. Zudem wurde in allen Zellen eine Blockade der Enzymaufnahme nach zusätzlicher M6P-Zugabe auf ein ähnliches Niveau (PS1 +/+ : 0,08 mU/mg; MPR46KO: 0,09 mU/mg; MPR300KO: 0,08 mU/mg; MPR46/300_KO: 0,05 mU/mg spezifische Enzymaktivität) detektiert (Abb. 3.16). Die Enzymaktivität aller Zellreihen nach Inkubation in Medium mit rhLAMAN und M6P überstieg jeweils die Enzymaktivität ohne rhLAMAN Zufuhr. Trotz Blockade der MPRs wurde eine geringe Aufnahme von rhLAMAN detektiert. Die prozentuale Zunahme der α -Mannosidaseaktivität im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen, die in Medium ohne rhLAMAN inkubiert wurden, betrug in PS1 +/+ -Zellen 800 %, in MPR46KO-Zellen 180 %, in MPR300KO-Zellen 133 % und in MPR46/300_KO-Zellen 167 % (Abb. 3.16).

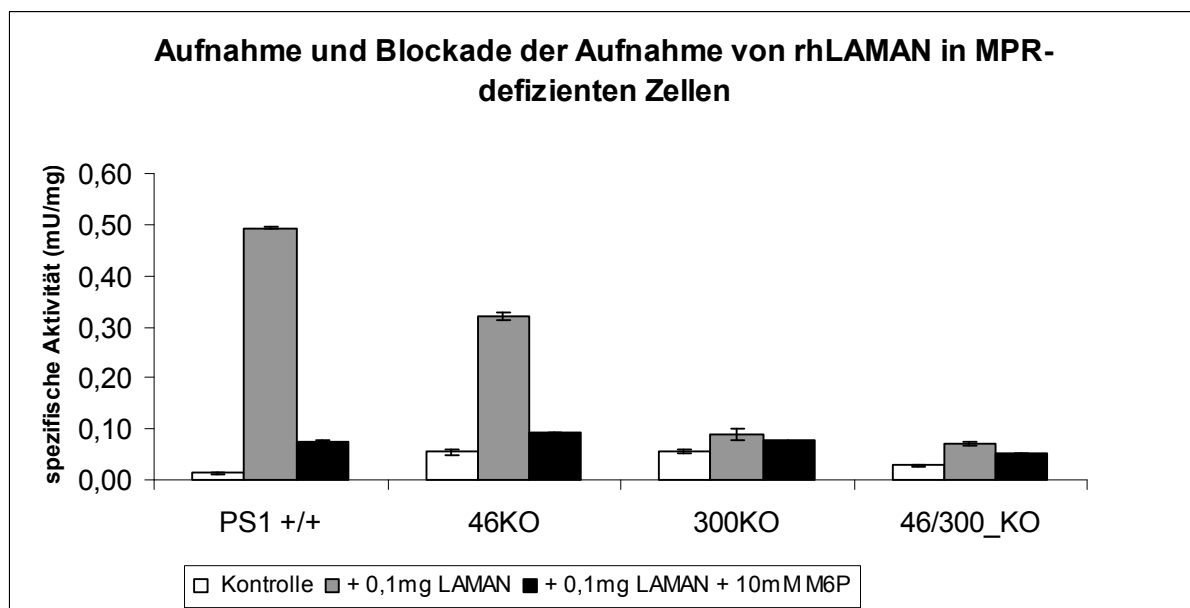


Abb. 3.16: spezifische Enzymaktivitäten der α -Mannosidase (2.2.2.6) in PS1 +/+, MPR46KO-, MPR300KO- und MPR46/300_KO-Zellen nach 3 stündigem Endozytoseassay ohne Zusatz, mit 0,1 mg rhLAMAN und mit 0,1 mg rhLAMAN plus 10 mM M6P als Zusatz im Medium (2.2.1.7). Inkubationszeit der Enzymassays: 15 Stunden.

In den MPR46KO-Zellen wurde, ähnlich wie in den Kontrollzellen, eine deutliche Aktivitätszunahme der α -Mannosidase nach Inkubation in rhLAMAN-haltigem Medium gemessen, was eine MPR300-abhängige Endozytose nahe legte. Bei der Analyse der MPR300-defizienten Zellen und der doppeldefizienten Zellen

(MPR46/300_KO) konnte jedoch ebenfalls ein geringgradiger Anstieg der Enzymaktivität nach Zugabe von rhLAMAN gemessen werden (MPR300KO: von 0,06 mU/mg auf 0,09 mU/mg spezifische Aktivität; MPR46/300_KO: von 0,03 mU/mg auf 0,07 mU/mg spezifische Aktivität) (Abb. 3.16). Diese Ergebnisse legten nahe, dass unter den gegebenen Bedingungen eine geringe MPR-unabhängige Aufnahme von rhLAMAN stattfindet.

3.4.3 Aufnahme von rhLAMAN in unterschiedlichen Dosen in MPR46/300_KO-Zellen

Auf dem Ergebnis des vorherigen Versuchs aufbauend, bei dem u. a. in MPR46/300_KO-Zellen bei Zufuhr von 0,1 mg rhLAMAN eine geringe Zunahme der Enzymaktivität der α -Mannosidase gemessen wurde, sollte in diesem Experiment eine mögliche dosisabhängige Steigerung der MPR-unabhängigen rhLAMAN-Aufnahme überprüft werden. Hierfür wurden PS1 +/- Zellen und MPR46/300_KO-Zellen in je fünf Gruppen aufgeteilt und in Medien mit unterschiedlichen Mengen an rhLAMAN für 3 Stunden inkubiert (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1_ Endozytosemedien für Versuch 3.3.3	
Gruppe 1	DMEM+ 1 % FCS+ 1 % PS
Gruppe 2	DMEM+ 1 % FCS+ 1 % PS+ 0,001 mg rhLAMAN (0,2 μ l)
Gruppe 3	DMEM+ 1 % FCS+ 1 % PS+ 0,01 mg rhLAMAN (2,1 μ l)
Gruppe 4	DMEM+ 1 % FCS+ 1 % PS+ 0,1 mg rhLAMAN (21 μ l)
Gruppe 5	DMEM+ 1 % FCS+ 1 % PS+ 0,5 mg rhLAMAN (105 μ l)

Die Messungen der spezifischen Aktivität der α -Mannosidase ergaben mit Ausnahme des Wertes von Gruppe 3 (0,01 mg rhLAMAN Zugabe) in den PS1 +/- Zellen eine stetige Zunahme der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Menge des zur Endozytose zu Verfügung stehenden Enzyms (Daten zum Teil gezeigt, Abb. 3.17). Die Werte der MPR-doppeldefizienten Zellen (MPR46/300_KO) fielen anders aus. Im Vergleich zu den in normalem Medium kultivierten Zellen (0,029 mU/mg spezifische Aktivität) wurde nach Zufuhr von 0,001 mg und 0,01 mg rhLAMAN eine minimale Reduktion der Enzymaktivität (0,024 mU/mg bzw. 0,026 mU/mg spezifische Aktivität), nach Inkubation im Medium mit 0,1 mg rhLAMAN dann ein leichter und nach Zugabe von 0,5 mg rhLAMAN ein deutlicher Anstieg der α -Mannosidaseaktivität

detektiert (0,034 mU/mg bzw. 0,133 mU/mg spezifische Aktivität) (Daten anteilig gezeigt in Abb. 3.17). Eine MPR-unabhängige Aufnahme von rhLAMAN scheint entsprechend bei Enzymangebot in hohen Dosen stattzufinden.

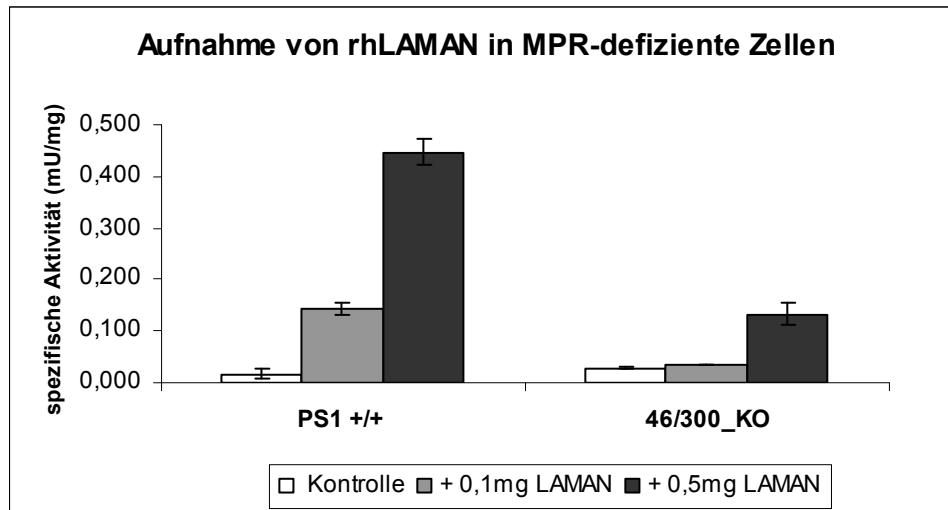


Abb. 3.17: Spezifische Enzymaktivitäten der α -Mannosidase (2.2.2.6) in PS1 +/+ und MPR46/300_KO Zellen nach 3 stündigem Endozytoseassay ohne Zusatz, mit 0,1 mg rhLAMAN und mit 0,5 mg rhLAMAN als Zusatz im Medium (2.2.1.7). Inkubationszeit der Enzymassays: 16 Stunden.

Wo in den MPR46/300_KO-Zellen das Enzym nach Endozytose lokalisiert ist, sollte mittels immunhistochemischer Untersuchungen geklärt werden. Hierfür wurden Kontrollzellen und MPR46/300_KO-Zellen in Medium mit 0,5 mg bzw. 1,0 mg rhLAMAN inkubiert und anschließend immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Nach Bindung des Primärantikörpers an rhLAMAN bzw. an das lysosomale Membranprotein LAMP1 wurden bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszierende Sekundärantikörper eingesetzt, sodass indirekt rhLAMAN mit einem mit fluoreszierendem Farbstoff Alexa Fluor 488 gekoppelten Antikörper markiert wurde, der bei einer Wellenlänge von 488 nm rot leuchtet, und daher in den Abbildungen grün erscheint. LAMP1 wurde indirekt mit einem Alexa Fluor 594 gekoppelten Antikörper markiert, der bei einer Wellenlänge von 594 nm grün fluoresziert, und erscheint entsprechend rot. Die Zellkerne kommen nach DAPI-Färbung blau zur Darstellung.

Sowohl in den Zellen mit Zufuhr von 0,5 mg rhLAMAN als auch in den Zellen, deren Endozytosemedium 1,0 mg des Enzyms enthielt, konnte eine Ko-Lokalisation von rhLAMAN (grün) in mit LAMP1 (rot) markierten spät-endosomalen/ lysosomalen Vesikeln abgebildet werden (Abb. 3.18). Somit erreicht rhLAMAN nach Zufuhr von großen Enzymmengen im Endozytosemedium vermutlich durch MPR-unabhängige

Aufnahme in embryonalen Mausfibroblasten den regelhaften, intrazellulären Bestimmungsort, die Lysosomen.

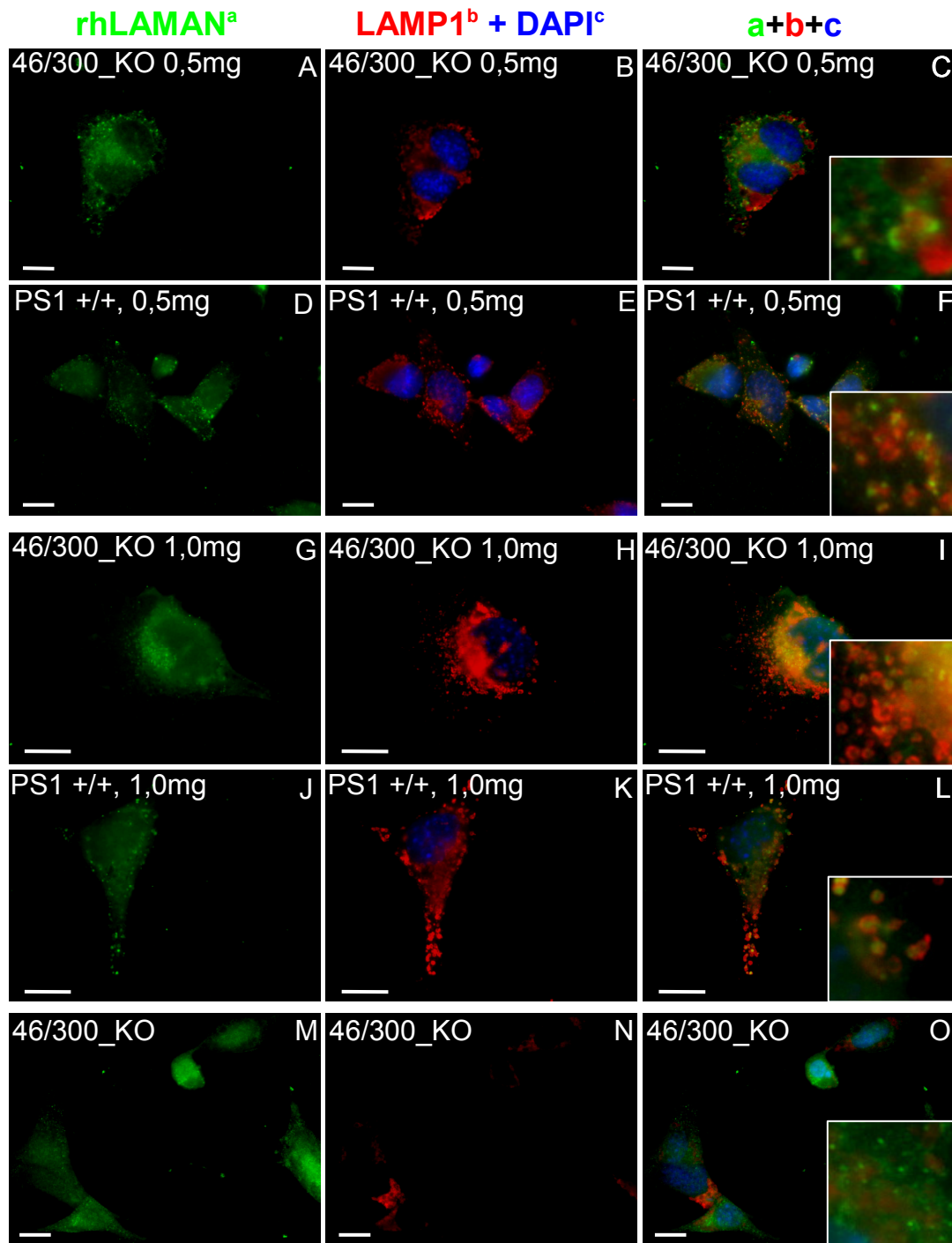


Abb. 3.18: Aufnahme von rhLAMAN in MPR46/300_KO-Zellen. Immunfluoreszenzmikroskopische Bilder (2.2.1.8) von PS1 +/+ und MPR46/300_KO Zellen nach 3-stündigem Endozytoseassay mit 0,5 mg bzw. 1 mg rhLAMAN als Zusatz im Medium (2.2.1.7) und als Kontrolle MPR46/300_KO-Zellen kultiviert in Medium ohne Zusatz. Als Primärantikörper wurden Laman rabbit (1:400) und LAMP1 rat (1:200) und als Sekundärantikörper Goat anti rabbit F488 (1:750) und Goat anti rat AF594 (1:750) genutzt, entsprechend ist rhLAMAN grün und LAMP1 auf den Bildern rot gefärbt. Zusätzlich wurde die Zellkernfärbung DAPI (1:1000) (blau) durchgeführt. In den Bildern C, F, I, L, O sind alle 3 Färbungen zusammen abgebildet. Maßeinheit jeweils 10 µm.

3.5. Analyse von Gehirnen adulter WT- und KO- Mäusen in zwei unterschiedlichen Altersstufen

Zur grundsätzlichen Beschreibung der Morphologie des Gehirns von α -Mannosidase KO-Mäusen auch im Vergleich zu anderen α -Mannosidose Tiermodellen und zur Beobachtung von möglichen altersabhängigen Unterschieden oder Variationen wurden die Gehirne von jungen und alten KO-Mäusen analysiert. Des Weiteren war es Ziel der folgenden Versuche potentielle hirorganische Ursachen der Aufnahme und des Übertritts von substituiertem rhLAMAN über die Bluthirnschranke, wie zum Beispiel Schrankenstörungen durch chronische Inflammation, abzuklären.

Gehirne von KO-Mäusen mit einem Durchschnittsalter von 1,5 Jahren wurden mit denen von 3 Monate alten KO-Mäusen verglichen. Die WT-Mäuse, die als Kontrolle dienten, waren 1,25 Jahre bzw. 2,5 Monate alt. Für jede Gruppe standen je drei Mäuse zur Verfügung, deren Gehirne entlang des Interhemisphärenspalts geteilt und sowohl mittels immunhistologischer (2.2.3.1, 2.2.3.2) (im Verlauf als Immunfluoreszenz bezeichnet) als auch biochemischer (2.2.2.1 bis 2.2.2.6) Verfahren untersucht wurden.

3.5.1 Analyse von Gehirnen von WT- und KO-Mäusen unterschiedlichen Alters mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Die immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Gehirnhälften erfolgte mit den Fragestellungen: ob im Vergleich zu WT-Mäusen ein Verlust an Neuronen (Nervenzellen) und damit die mögliche Degeneration des ZNS zu beobachten sei; ob eine Reaktion der Astrozyten (cerebrale Stützzellen) als früher und sensibler Marker für neuropathologischen Umbau vorläge; ob eine Demyelinisierung zu verzeichnen sei und ob lokale Entzündungen in Form von aktivierter Mikroglia (Entzündungszellen des Gehirns) festzustellen wären, woraus möglicherweise eine Leckage der Bluthirnschranke folgen könnte.

Es erfolgte entsprechend eine Anfärbung der Nervenzellen mittels Antikörper gegen NeuN, ein für Neuronen spezifisches Zellkernprotein; die Detektion der Astrozyten durch die Markierung des GFAP (gliales fibrilläres saures Protein), des Hauptbestandteils der Intermediärfilamente im Zytoplasma von Gliazellen wie Astrozyten, sowie der Nachweis des Myelinisierungsgrades mit Hilfe von Antikörpern gegen das so genannte Myelin-bindende-Protein MBP und die Analyse eines möglichen

Entzündungsgeschehens durch den Gebrauch von biotinyliertem GSA-Antikörper, der spezifisch an ein für Mikroglia spezifisches Lectin, das Griffonia simplicifolia agglutinin Isolectin B4, bindet und bereits kovalent mit Biotin verbunden ist. Auf den Immunfluoreszenzaufnahmen werden Anschnitte der Hippocampi (Teile des Gehirns, die in den Temporallappen liegen und zum limbischen System gehören) und der Cerebelli (Kleinhirne) abgebildet. Krankheitsbedingte neurokognitive Defizite, ein hoher Grad an Speichervakuolen in den Hippocampi sowie die cerebelläre Ataxie begründeten die Auswahl der abgebildeten Strukturen. Für die Darstellung ist zur besseren Anschaulichkeit jeweils ein Tier pro Alters- und Genotyp-Gruppe (vier Gruppen je n=3) als Repräsentant dieser abgebildet.

Die Immunfluoreszenzbilder zeigten vergleichbare Fluoreszenzintensitäten bei der Färbung mit NeuN in Gehirnen der KO-Mäuse und WT-Mäuse in beiden Altersgruppen. Weder im Hippocampus noch im Cerebellum der KO-Mäuse war im Verhältnis zu den Gehirnantteilen der WT-Mäuse ein Anhalt für eine Abweichung neuronaler Strukturen erkennbar. Es schien nicht zu einem deutlichen Abbau von NeuN positiven Neuronen oder deren Hypoplasie im Rahmen der Krankheitsentwicklung zu kommen (Abb. 3.19, Abb. 3.20). Die GFAP-Färbung wirkte in den Abbildungen der Hippocampi unabhängig vom Alter sowohl bei den WT-Mäusen als auch bei den KO-Mäusen gleichmäßig (Abb. 3.19). Im Gegensatz dazu erschien die Anfärbung von GFAP als Hinweis auf einen neuropathologischen Umbau in den Cerebelli der KO-Mäuse stärker ausgeprägt als in den Cerebelli der WT-Mäuse. Dies galt sowohl im Vergleich zwischen jungen Mäusen als auch im Vergleich zwischen älteren Mäusen (Abb. 3.20).

Des Weiteren lagen bei gleichmäßig starker Anfärbung von Myelin mittels MBP-Antikörper keine Hinweise auf eine Demyelinisierung der zentralen Neurone in Gehirnen von KO-Mäusen vor (Abb. 3.21). Mit Hilfe der Markierung von Mikroglia durch biotinyliertes GSA konnte zudem keine Aktivierung dieser Zellen in Gehirnen von KO-Mäusen nachgewiesen werden. Sowohl im Bereich der Hippocampi als auch der Cerebelli waren keine Unterschiede in der Ausprägung der Fluoreszenz zwischen den Gehirnen der KO- und der WT-Mäuse erkennbar (Abb. 3.21). Eine Färbung mit dem Makrophagen-Marker F4/80, die ebenfalls einen möglichen entzündlichen Prozess im Gehirn von α -Mannosidase KO-Mäusen anzeigen könnte, war trotz Wiederholung vermutlich aufgrund Verfahrensfehler nicht auswertbar.

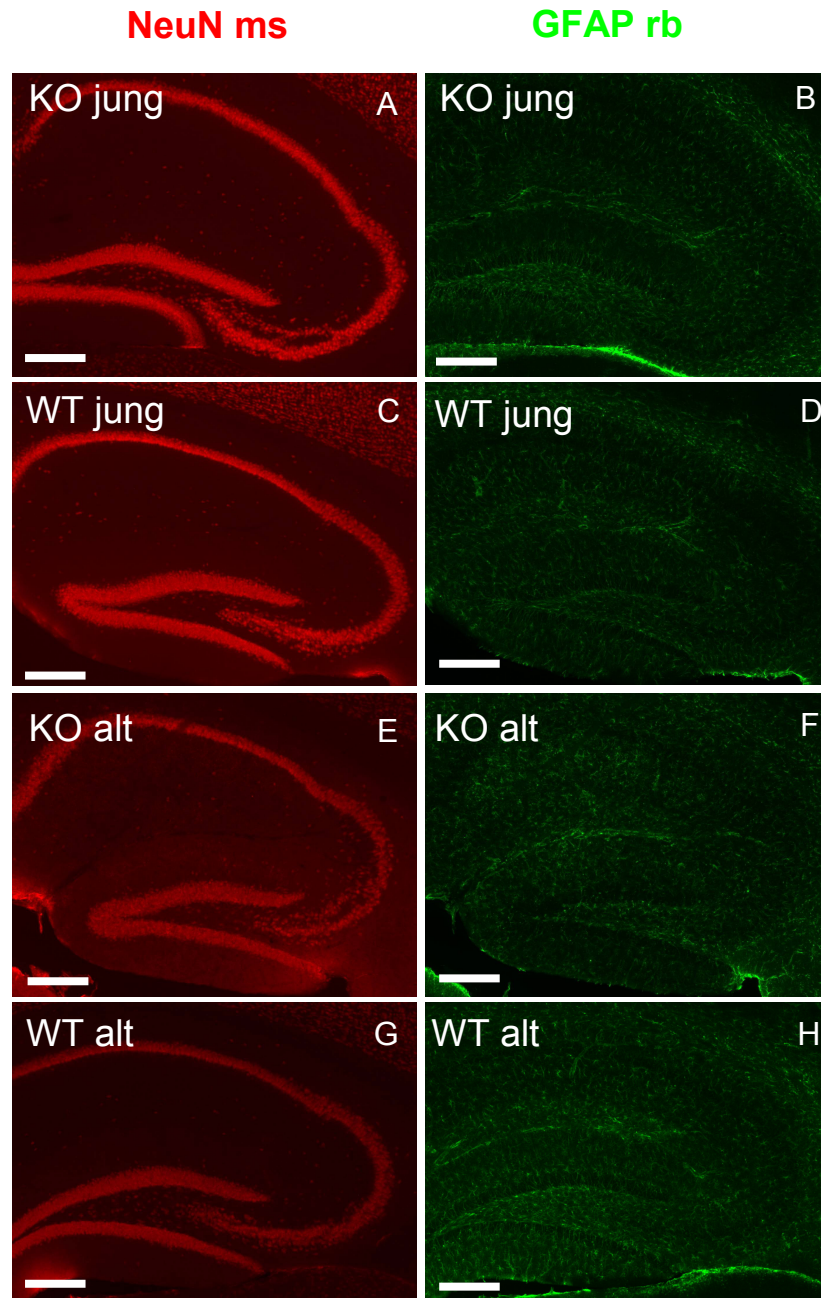


Abb. 3.19: Vergleich der Hippocampi in Bezug auf neuronale Veränderungen und reaktive Astrozytose, Immunfluoreszenzbilder. 40 µm dicke Schnitte der Gehirnhälften von jungen (A, B) und alten (E, F) KO-Mäusen und von jungen (C, D) und alten (G, H) WT-Mäusen wurden nach Protokoll der Immunhistochemie (2.2.3.1, 2.2.3.2) gefärbt. Primärantikörper: NeuN ms (1:1000) und GFAP rb (1:500), nach Sekundärantikörperfärbung erscheinen NeuN rot und GFAP grün fluoreszierend. Maßeinheit: 200 µm.

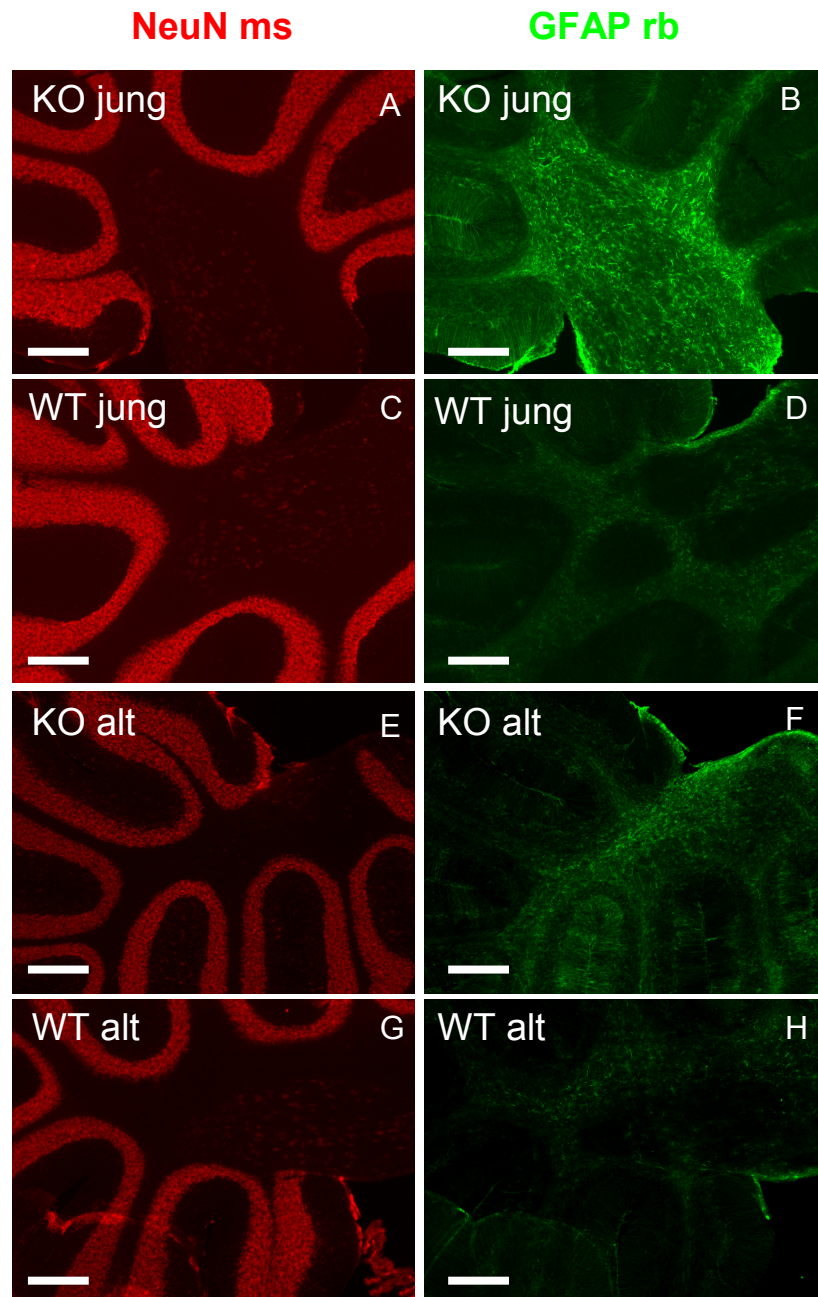


Abb. 3.20: Vergleich der Cerebelli in Bezug auf neuronale Veränderungen und reaktive Astrozytose, Immunfluoreszenzbilder. 40 µm dicke Schnitte der Gehirnhälften von jungen (A, B) und alten (E, F) KO-Mäusen und von jungen (C, D) und alten (G, H) WT-Mäusen wurden nach Protokoll der Immunhistochemie (2.2.3.1, 2.2.3.2) gefärbt. Primärantikörper: NeuN ms (1:1000) und GFAP rb (1:500), nach Sekundärantikörperfärbung erscheinen NeuN rot und GFAP grün fluoreszierend. Maßeinheit: 200 µm.

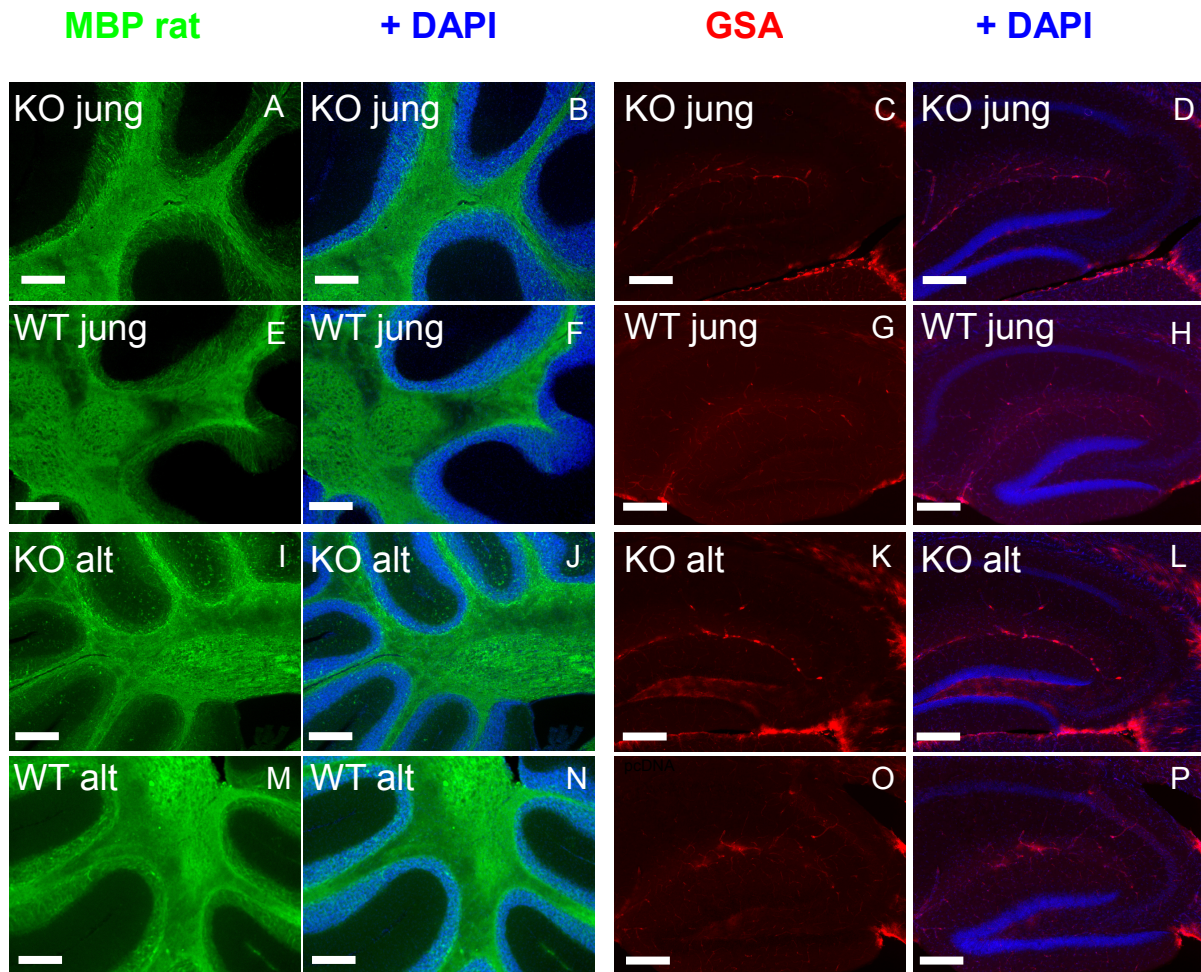


Abb. 3.21: Vergleich der Cerebelli in Bezug auf den Myelingeht und Vergleich der Hippocampi in Bezug auf das Vorhandensein von inflammatorischen Prozessen, Immunfluoreszenzbilder. 40 μ m dicke Schnitte der Gehirnhälften von jungen (A-D) und alten (I-L) KO-Mäusen und von jungen (E-H) und alten (M-P) WT-Mäusen wurden nach Protokoll der Immunhistochemie (2.2.3.1, 2.2.3.2) gefärbt. In Spalte 1 + 2 von links sind Schnitte der Cerebelli mit MBP rat (1:300) angefärbt und in Spalte 3 + 4 von links Hippocampi mit biotinyliertem GSA (1:200) angefärbt abgebildet. Nach Sekundärantikörperfärbung erscheint MBP grün und GSA (mit Streptavidin) rot fluoreszierend. Zusätzlich wurde eine Zellkernfärbung mit dem Farbstoff DAPI (1:1000) (blau) durchgeführt. Die Immunfluoreszenzbilder B, F, J, N und D, H, L, P zeigen jeweils beide Färbungen zusammen. Maßeinheit: 200 μ m.

3.5.2 Westernblotanalysen von Gehirnen von WT- und KO-Mäusen unterschiedlichen Alters

Neben den immunhistologischen Untersuchungen erfolgte die biochemische Analyse der Expression oben genannter Markerproteine für neuronal degenerative Veränderungen (NeuN), Astroglie (GFAP), Demyelinisierung (MBP) und aktivierter Mikroglia im Rahmen von Entzündungsprozessen (GSA). Zusätzlich wurde die für α -Mannosidose krankheitstypische lysosomale Akkumulation von Speichermaterial, die die Entstehung von großen lysosomalen Speichervakuolen zur Folge hat, beurteilt, indem die damit verbundene Zunahme der Expression der lysosomalen

Membranproteine LAMP1 und LAMP2 (im Gehirn Banden jeweils bei 80-90 kDa) mittels Antikörper detektiert wurden.

Um einen möglichen Unterschied in der Konzentration von zentralen Nervenzellen in Gehirnen junger und älterer KO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen zu erfassen, wurden für Neuronen spezifische Antikörperfärbungen gegen NeuN (s.o., Banden bei 92 kDa, 66 kDa und 46-48 kDa) und NF68 (68 kDa großes Neurofilament) durchgeführt. Hierbei konnte bei der NeuN-Antikörperfärbung, die ein spezielles Protein des Nervenzellenkerns bindet, eine leichte Reduktion der Signalstärke in Proben von jungen und älteren KO-Mäusen im Vergleich zu gleichalten WT-Mäusen detektiert werden. Der Vergleich der Banden in Proben junger und alter KO-Mäuse zeigte ähnliche Detektionsintensitäten, also keine altersbedingte Differenz (Abb. 3.22_A). Nach der Markierung der Neurofilamente der Nervenzellen mit dem NF68-Antikörper stellten sich die Signale der KO-Mäuse und der Kontrolltiere in beiden Altersstufen gleich intensiv dar (Abb. 3.22_B).

Die Überprüfung von Veränderungen in den Astrozyten zeigte in der protein-biochemischen Untersuchung der Gehirne von KO-Mäusen in beiden Altersstufen ein deutlich stärkeres Signal nach der GFAP-Antikörperfärbung (Bande bei 50 kDa) im Vergleich zu den Proben der WT-Mäuse (Abb. 3.22_C). Bei der Markierung des Myelins mit der Fragestellung nach einer Abschwächung des Signals als Zeichen einer Demyelinisierung in Gehirnen der KO-Mäuse erschienen die Expressionssignale vom Markerprotein MBP (5-17 kDa) im Alter zunehmend in beiden Gruppen gleich stark bzw. in den KO-Mäusen zum Teil intensiver (Abb. 3.22_D). Zur Untersuchung der Mikroglia wurde ein Antikörper gegen das mikrogliale Antigen CD11b (165 kDa) durchgeführt. Trotz mehrfacher Wiederholung konnte kein adäquat auswertbarer Westernblot mit dieser CD11b-Färbung generiert werden.

In den Lysaten der KO-Mäuse beider Altersstufen wurde eine stärkere Bandenintensität bei der Färbung mit LAMP1- und LAMP2-Antikörpern im Vergleich zu den WT-Mäusen als Hinweis auf die lysosomale Ablagerung von bei α -Mannosidose krankheitstypischem Speichermaterial detektiert. In den Proben der älteren Mäuse war dieser Unterschied visuell weniger eindeutig. Bei der Gegenüberstellung der Bandenintensitäten der Lysate von älteren und jungen Mäusen fiel zudem eine altersabhängige Steigerung der Expression von LAMP1 und LAMP2 sowohl in KO-Mäusen als auch in WT-Mäusen auf. Eine Zunahme an Lysosomen-

anzahl bzw. –größe scheint unabhängig des Genotyps mit zunehmendem Alter ein normaler, physiologischer Prozess zu sein (Abb. 3.23).

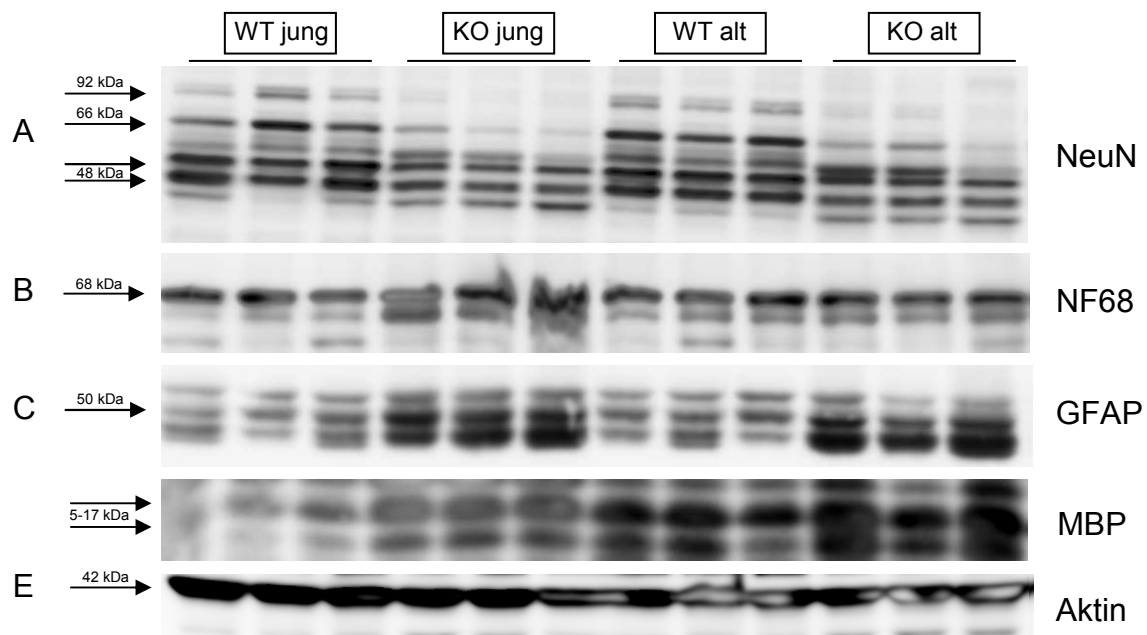


Abb. 3.22: Westernblotanalyse zum Vergleich der Gehirne_1. Je 45 µg Gesamtprotein der Gehirne von je 3 jungen und alten WT- und KO-Mäusen wurden über 12,5 % SDS-PAGE-Gele aufgetrennt und mit den Antikörpern NeuN_ms (A), NF68_ms (B), GFAP_rb (C) und MBP_rat (D) detektiert. Aktin (E) wurde als Ladekontrolle detektiert (2.2.2.1 bis 2.2.2.5).

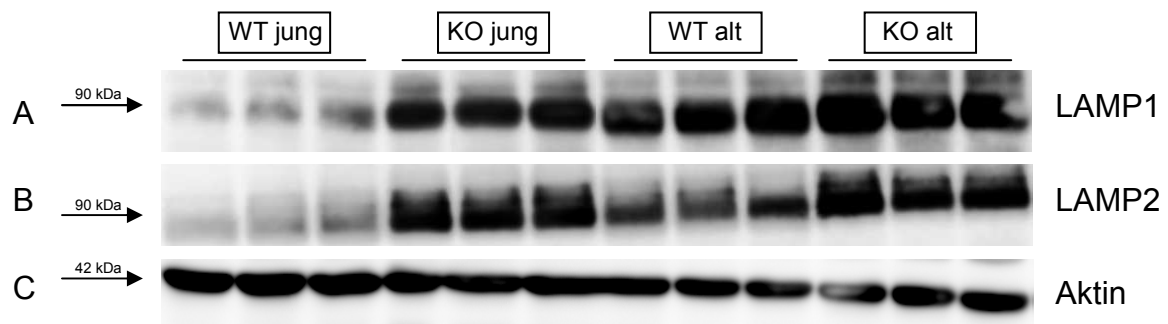


Abb. 3.23: Westernblotanalyse zum Vergleich der Gehirne_2. Je 30 µg Gesamtprotein der Gehirne von je 3 jungen und alten WT- und KO-Mäusen wurden über 12,5 % SDS-PAGE-Gele aufgetrennt und mit den Antikörpern LAMP1_rat (A) und LAMP2_rat (B) detektiert. Aktin (C) wurde als Ladekontrolle detektiert. (2.2.2.1 bis 2.2.2.5).

4. Diskussion

Eine entscheidende Therapieform für Lysosomale Speichererkrankungen, deren Krankheitsursache vor allem in der Defizienz lysosomaler Hydrolasen liegt, stellt die Enzymersatztherapie dar (Grabowski & Hopkin, 2003). Lysosomale Enzyme werden im rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Sie besitzen Mannose-6-Phosphat-Reste, die spezifisch von MPRs gebunden und in diesem Komplex zu den Lysosomen transportiert werden (Braulke & Bonifacio, 2009). Die zelluläre Aufnahme löslicher lysosomaler Enzyme von extrazellulär erfolgt zumeist auf diese Weise mittels plasmamembranständigen MPRs in Form von rezeptorvermittelter Endozytose (Ghosh u. a., 2003). Diese eröffnete die Möglichkeit einer Substitutionstherapie für Patienten mit aus Enzymdefizienz resultierenden Lysosomalen Speichererkrankungen (Pohlmann u. a., 1983; Neufeld, 1980; Hickman & Neufeld, 1972). Die Rezeptoren binden einerseits extrazelluläre lysosomale Enzyme an deren M6P-Rest und transportieren sie über den endozytotischen Weg zu den Lysosomen, andererseits besitzen diese Rezeptoren zudem eine Bindungsstelle für den *Insulin-like-growth factor II* (IGF2) (Nielsen u. a., 1991).

Die intravenöse Applikation von rekombinanten Enzymen ist derzeit als Therapie für sechs lysosomale Erkrankungen zugelassen (s. Tab. 1.2), deren Symptomkontinuum auf die Beeinträchtigung peripherer Gewebe und Organe durch krankheitsspezifische Akkumulation von Makromolekülen zurückzuführen ist. Aufgrund der Beobachtung, dass rekombinante Enzyme die Bluthirnschranke nicht bzw. nur geringfügig überqueren und somit die zentralen Gewebe lediglich in geringem Maße erreichen, stößt die Enzymersatztherapie für Patienten derzeit in Bezug auf den therapeutischen Nutzen an Grenzen, wenn, wie bei α -Mannosidose, pathologische Veränderungen im Gehirn als zentrales Charakteristikum der Läsion vorliegen (Begley u. a., 2008; Desnick & Schuchman, 2002).

Das Design der in dieser Arbeit durchgeführten Studien am Mausmodell wurde durch die teilweise begrenzte Anzahl der zur Verfügung stehenden α -Mannosidase KO-Mäuse sowie durch nicht unbeschränkt vorliegende Mengen an Substitutionseenzym soweit limitiert, dass in der Regel je ein bis zwei KO-Mäuse als Negativkontrollen nicht behandelt (KO*, mit PBS scheinbehandelt) und je zwei bis drei KO-Mäuse zur Untersuchung der Substitutionseffektivität mit rhLAMAN behandelt wurden.

4.1. Enzymaufnahme ins Gehirn

4.1.1 Überwinden der Bluthirnschranke früh-postnatal und nach Modifizierung des Protokolls der Enzyersatztherapie möglich

Im Rahmen dieser Arbeit (s. 3.1) konnte eine partielle Entspeicherung des Gehirngewebes nach venös injizierter Hochdosis-Enzymsubstitution detektiert werden. Die quantitative Auswertung der Zuckerextraktionen in Versuch 3.1 zeigte, dass eine Reduktion von über 70 % der krankheitstypischen mannosehaltigen Oligosaccharide in Gehirnproben von α -Mannosidase KO-Mäusen durch die Behandlung mit vier Mal 500 mU/mg KG vier Tage nach der letzten Injektion erreicht wurde (Abb. 3.2, Abb. 3.3). Zwar konnte im Vergleich zu den Ergebnissen der peripheren Organe im weiteren zeitlichen Verlauf eine schnellere Reakkumulation des Speichermaterials im Gehirn detektiert werden, dennoch wurde selbst 12 Tage nach der letzten therapeutischen Dosis eine bessere Stoffwechsellage in den Gehirnen der KO-Mäuse verglichen mit der der unbehandelten KO*-Mäuse beobachtet (Abb. 3.2, Abb. 3.3).

Im Gegensatz zum ZNS zeigte sich im peripheren Nervengewebe ein anderes Ergebnis. Keinerlei Reakkumulation wurde nach 12 Tagen in den trigeminalen Ganglien als Repräsentant des Peripheren Nervensystems nachgewiesen (Abb. 3.4). Dies ist vermutlich auf die erhöhte Durchlässigkeit der so genannten Blutnervenschranke für größere Moleküle zurückzuführen (Arvidson, 1979). Das Endothel der endoneuralen Kapillaren fungiert durch seine *Tight junctions* als Blutnervenschranke. Sie weist ebenfalls wie die Bluthirnschranke eine Abgrenzfunktion zwischen hier peripheren Nerven und anderen Geweben auf (Lüllmann-Rauch, 2006).

Neben der Reduktion von mannosehaltigen Oligosacchariden in den Zuckerextraktionen der Gehirnproben von KO-Mäusen wurde auch histologisch der Nachweis der geringeren Akkumulation von Speichermaterial nach durchgeführter Enzyersatztherapie erbracht, indem in Semidünnschnitten des Gehirns eine Reduktion der Anzahl der Speichervakuolen erkennbar war (Abb. 3.5). Da zudem ein Anstieg der spezifischen Aktivität von α -Mannosidase in den Proben der Gehirnlysate der KO-Mäuse um 50 % im Vergleich zu den Messwerten der Proben der unbehandelten KO*-Mäuse auf über ein Viertel der physiologischen Enzymaktivität im Verhältnis zu den Ergebnissen der Homogenisate von WT-Gehirnen verzeichnet werden konnte (Abb. 3.1), muss von einer Aufnahme des applizierten rhLAMAN in

das Gehirn und somit von einem Überwinden der Bluthirnschranke ausgegangen werden.

Nachdem zunächst der Standpunkt vertreten wurde, dass substituierte lysosomale Enzyme nicht in der Lage sind die Bluthirnschranke zu überqueren, konnten für einige Lysosomale Speichererkrankungen im Tiermodell Erfolg versprechende Ergebnisse verzeichnet werden (Enns & Huhn, 2008). Die Fähigkeit die Bluthirnschranke zu überwinden scheint abhängig vom Lebensalter der behandelten Tiere sowie durch Variationen des Prozederes der Enzyersatztherapie erreichbar zu sein. Im Mausmodell der MPS VII wurde zum Beispiel gezeigt, dass die intravenöse Gabe der bei dieser Krankheit defizienten β -Glucuronidase (GUS) in peripheren Geweben stets die Elimination des akkumulierten Speichermaterials, den Glykosaminoglykanen (GAGs), zur Folge hatte. Zudem konnte eine Reduktion der Ablagerungen im Gehirn detektiert werden, wenn ein Therapiebeginn vor Erreichen eines Lebensalters von zwei Wochen der Mäuse stattfand (Vogler 1999). Vergleichbare Ergebnisse wurden im Mausmodell der Aspartylglycosaminurie und der MPS III generiert (Dunder u. a., 2010; Gliddon & Hopwood, 2004). Bei der Therapie der MPS III war applizierte Sulfamidase in der Lage die Bluthirnschranke bis zu einem Lebensalter von 10 bis 14 Tagen zu überqueren. Die daraus resultierende Entspeicherung der zentralen Gewebe führte zu einer Verzögerung der Erstmanifestation der Erkrankung (Gliddon & Hopwood, 2004). Diese Beobachtungen legten die Vermutung nahe, dass lysosomale Enzyme die Bluthirnschranke überwinden und das Gehirn erreichen können, solange diese physiologische Barriere noch nicht voll ausgereift sondern noch inkomplett und damit durchlässiger ist.

Eine weitere Erklärung für die Fähigkeit der intravenös applizierten, phosphorylierten Substitutionsenzyme über die Bluthirnschranke in zentrale Gewebe von neonatalen KO-Mäusen zu gelangen lieferte Urayama 2004. In Versuchen mit neonatalen MPS VII-Mäusen wurde eine vermehrte Aufnahme in das Gehirn von phosphorylierter β -Glucuronidase (p-GUS) im Vergleich zur nicht phosphorylierten Form dieses Enzyms (GUS) beschrieben, welche wiederum durch die Zugabe von M6P oder GUS reduziert wurde. Diese Ergebnisse würden darauf schließen lassen, dass es sich bei dem Transportsystem über die Bluthirnschranke in dieser kurzen postnatalen Zeitspanne um eine MPR-vermittelte Transzytose handle, da M6P der spezifische Ligand der MPRs ist (Urayama u. a., 2004)

Auch bei Forschungen zur Krankheit MPS III wurden im Mausmodell in Bezug auf den Übertritt des defizienten Enzyms Sulfamidase über die Bluthirnschranke vergleichbare Messwerte erhoben (Urayama u. a., 2008). Laut beider Studien sei dieses rezeptorvermittelte Transportsystem im Alter von sieben bis acht Wochen bereits herunterreguliert und stehe im Erwachsenenalter der Mäuse nicht mehr zur Verfügung (Urayama u. a., 2004). Dieser Umstand würde wiederum die erhebliche Schwierigkeit und Herausforderung des Übertritts über die Bluthirnschranke und des Erreichens des Gehirngewebes mittels Enzymersatztherapie in adulten Tieren erklären. Sowohl in dem Mausmodell der MPS III als auch in dem der MPS VII konnte demnach in bis zu mehrere Wochen alten Jungtieren ein effektives Überqueren von intravenös applizierten lysosomalen Enzymen über die Bluthirnschranke nachgewiesen werden. Dies wird mit der nicht vollständig ausgebildeten Integrität und der damit noch vorhandenen Durchlässigkeit der Bluthirnschranke begründet, zudem kann als Ursache für ein transzytotisches Überwinden dieser Barriere des ZNS das Vorkommen von MPRs an neonatalen Bluthirnschranken angesehen werden (Urayama u. a., 2008).

Bei der Untersuchung der α -Mannosidase KO-Mäuse in Bezug auf die Fragestellung, ob auch die Aufnahme von rhLAMAN bei Jungtieren aus den eben genannten Gründen gesteigert ist, wurden Mäuse in drei unterschiedlichen Altersgruppen untersucht (s. 3.3). Die Ergebnisse der Analysen der Gehirnprouben von drei Monate alten (3Mo) und 21 Tage alten (P21) KO-Mäusen können bei der Bestimmung der Enzymaktivität und bei der Detektion von rhLAMAN im Westernblot sowie der Detektion der krankheitstypischen mannosehaltigen Oligosaccharide als hinweisend auf eine Entspeicherung des Gehirngewebes interpretiert werden, da sowohl ein Anstieg der spezifischen Aktivität der α -Mannosidase (Abb. 3.11) als auch eine Nachweis von rhLAMAN mittels Immunoblot (Abb. 3.12) und eine Reduktion der Oligosaccharide (Abb. 3.14) in den Proben der Gehirne von KO-Mäusen nach nur zweimaliger Injektion von 500 mU/mg KG rhLAMAN detektiert werden konnte. Die Färbung von LAMP1 im Westernblot hingegen bestätigte die Annahme einer Entspeicherung des Gehirngewebes nach Enzymsubstitution nicht, da die Expression von LAMP1 in Proben von behandelten KO-Mäusen denen der unbehandelten KO*-Mäuse glich und somit nicht von einer Reduktion der lysosomalen Speichervakuolen ausgegangen werden konnte (Abb. 3.13). Im Gegensatz dazu konnte in den Gewebeprouben der Gehirne der P8-Gruppe ein dezenter Rückgang

der LAMP1-Expression, was als ein Indiz für den Rückgang an Speichervakuolen nach Enzyersatztherapie gilt (Abb. 3.13.) und zudem eine leichte Reduktion an detektierbaren mannosehaltigen Oligosaccharidbanden in der Dünnschichtchromatographie (Abb. 3.14) gemessen werden. Die Untersuchung der P8-Proben in Bezug auf die spezifische Aktivität der α -Mannosidase in den Gehirnen (Abb. 3.11) ergab hingegen keine Hinweise auf eine Entspeicherung nach Enzymsubstitution. Eine rein visuelle Beurteilung der Dünnschichtchromatographie kann nicht als eindeutiges Kriterium angesehen werden, da geringgradige Unterschiede bei der Detektion der Banden vom menschlichen Auge nicht sicher erfasst werden können. Eine potentiell schlecht durchgeführte Enzyersatztherapie bei den P8-Mäusen in Form von mangelhaften Injektionsgaben kann aufgrund des Anstiegs der Enzymaktivität der α -Mannosidase in Milzproben der KO-Mäuse auf Wertniveau der Kontrolltiere sowie aufgrund der eindeutigen Detektierbarkeit von rhLAMAN bei der Analyse der peripheren Lysate mittels Westernblot (Abb. 3.12) ausgeschlossen werden.

Trotz der physiologischen, altersbedingten Insuffizienz der Bluthirnschranke konnte zwar ein vergleichsweise deutlicher Rückgang der LAMP1-Expression im Westernblot und eine geringe Reduktion der Akkumulation von mannosehaltigen Oligo-acchariden mit der sensitiven Methode der Dünnschichtchromatographie, jedoch keine stärkere Enzymaufnahme in das Gehirn mittels Enzymassay oder Immunoblot in den Gehirnen der P8-Mäuse im Vergleich zu den Mäusen höheren Lebensalters detektiert werden. Diese nicht eindeutigen Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die Aufnahme von rhLAMAN in das Gehirn nicht vom Alter der behandelten KO-Mäuse abhängig zu sein scheint. Theoretisch ist es denkbar, dass ein Alter von 8 Lebenstagen bereits zu weit fortgeschritten ist, um einen signifikanten Unterschied in der Effektivität der Enzyersatztherapie in Bezug auf die ZNS-Wirksamkeit zu detektieren, da laut Gliddon die Bluthirnschranke bereits nach 10 bis 14 Tagen ihre vollständige Integrität ausgebildet habe (Gliddon & Hopwood, 2004). Da Urayama hingegen eine Niederregulation der MPR-abhängigen Transzytose während der ersten sieben Lebenswochen (49 Tage) beschreibt (Urayama u. a., 2004), sollten bezüglich des möglichen MPR-vermittelten Transportweges in 8 Tage alten Mäusen jedoch keine Einschränkungen vorliegen.

Obwohl in adulten Versuchstieren weder ein direkter Zugang ins ZNS über die intakte, geschlossene Bluthirnschranke noch eine mit der neonatalen Situation vergleichbare MPR-Rezeptorendichte an der Bluthirnschranke besteht, konnte durch

Variationen im Prozedere der Enzyersatztherapie auch in adulten Versuchstieren der Übertritt von applizierten lysosomalen Enzymen über die Bluthirnschranke und die Reduktion von akkumuliertem Speichermaterial erreicht werden.

Im Mausmodell der Aspartylglycosaminurie, der ein Mangel an Glycosylasparaginase zu Grunde liegt (Kaartinen u. a., 1996), wurde mittels Hochfrequenztherapie in Form von acht intravenösen Injektionen innerhalb von zwei Wochen und damit einer Applikation von 10 mg/kg KG des fehlenden Enzyms eine Reduktion der Akkumulation von Aspartylglucosamine um 20 % in Gehirnen behandelter Mäuse beschrieben (Dunder u. a., 2000). Zudem wurde ein Anstieg der cerebralen Enzymaktivität der Glycosylasparaginase auf 10 % der physiologischen Enzymaktivität in gesunden Mäusen angegeben (Dunder u. a., 2000). Aufgrund der geringen Injektionsintervalle wurde letztlich eine hohe Enzymdosis durch Kumulation der Einzeldosen verabreicht. In anderen Studien, wie dieser, wurden direkt hohe Einzelenzymdosen appliziert.

Sowohl bei der Enzyersatztherapie im Mausmodell der Metachromatischen Leukodystrophie als auch bei der Therapieerforschung der MPS VII mittels Enzymsubstitution wurden vier Mal 20 mg/kg KG an defizientem Enzym über 4 Wochen injiziert und als Folge ein Rückgang der Ablagerungen von krankheitstypischem Speichermaterial im Gehirn und Rückenmark bzw. der Anstieg an spezifischer Aktivität des applizierten Enzyms in Analysen von behandelten Gehirnproben detektiert (Matzner u. a., 2005; Vogler u. a., 2005). Eine Enzym-Hochdosistherapie mit resultierender effektiver Entspeicherung zentraler Gewebe wurde auch im Meerschweinchenmodell und im Mausmodell der α -Mannosidose beschrieben (Crawley u. a., 2006; Roces u. a., 2004). Es konnte im Meerschweinchenmodell eine Reduktion von bis zu 39 % an Speichermaterial im ZNS nach Gabe von 10 mg/kg KG α -Mannosidase und im Mausmodell eine Reduktion von über 70 % an mannosehaltigen Oligosacchariden im Gehirn nach Gabe von zwei Mal 250 mU/mg KG rhLAMAN beobachtet werden (Crawley u. a., 2006; Roces u. a., 2004).

Diese Ergebnisse der Hochdosistherapie konnten in dieser Arbeit im Rahmen der Analyse des Reakkumulationsablaufs nach Entspeicherung (s. 3.1) bestätigt werden. Eine Reduktion von über 70 % der krankheitstypischen mannosehaltigen Oligosaccharide in Gehirnproben von α -Mannosidase KO-Mäusen konnte nach der Behandlung mit rhLAMAN im Therapieschema vier Mal 500 mU/mg alle 3,5 Tage detektiert werden (Abb. 3.2, Abb. 3.3). Neben der Steigerung der Applikationsdosis,

die ein Absättigen der peripheren Rezeptoren und damit eine höhere Verfügbarkeit des applizierten Enzyms an der Bluthirnschranke vermuten lässt, wurde ebenfalls über die Möglichkeit eines Übertritts von intravasal injizierten lysosomalen Enzymen über die Bluthirnschranke in adulten Gehirnen von MPS VII-Mäusen durch pharmakologische Manipulation der MPRs mittels Adrenalininjektionen berichtet. Der Anstieg des MPR-vermittelten Transports von phosphorylierter Glucuronidase über die Bluthirnschranke in adulten Mäusen nach Adrenalingabe erreichte ein Level, das dem in neonatalen Mäusen mit MPS VII ähnlich sei (Urayama u. a., 2008). Eine daraus resultierende Reduktion von akkumuliertem Speichermaterial im Gehirn wurde bei diesem Verfahren der Parallelinjektion beobachtet (Urayama u. a., 2008). Neben diesen Untersuchungen legten zudem die Ergebnisse von Experimenten bezüglich des Übertritts über die Bluthirnschranke mit einer Blockierung durch monoklonalen Antikörpern gegen den IGF2R an Primaten (Boado u. a., 2007) die Vermutung nahe, dass der Transport phosphorylierter Enzyme über die Bluthirnschranke mittels MPR/IGF2R erfolgt.

4.1.2 Mannose-6-Phosphat unabhängige Enzymaufnahme

Die Versuchstiere, die in dieser Arbeit zur Enzyzersatztherapie genutzt wurden, weisen vermutlich aufgrund ihres fortgeschrittenen Alters keine nennenswerte MPR-Expression an der Bluthirnschranke auf, sodass ein MPR-abhängiger Aufnahmeweg von rhLAMAN in das Gehirn sehr unwahrscheinlich ist. Auch die Tatsache, dass rhLAMAN wenig phosphoryliert ist, spricht gegen eine MPR-abhängige Aufnahme in das Gehirn. Da jedoch nach Enzymsubstitution ein deutlicher Rückgang der Ablagerung von Speichermaterial in Gehirngeweben detektiert wurde und somit der Übertritt des venös applizierten rhLAMAN über die Bluthirnschranke nachgewiesen wurde, kann ein anderer Transportweg ins ZNS vermutet werden. Zur Überprüfung dieser These wurden Zellversuche mit MPR-defizienten Zellen durchgeführt.

Nach den Messergebnissen der in-vitro-Versuchsreihe dieser Arbeit (s. 3.4) scheint die endozytotische Aufnahme von rhLAMAN bei fehlendem MPR46 etwas vermindert und bei Abwesenheit des MPR300 deutlich reduziert, im Vergleich zu den Kontrollzellen jedoch nicht gänzlich aufgehoben zu sein (Abb. 3.16). Diese Ergebnisse führten zunächst zu der Schlussfolgerung, dass rhLAMAN vor allem mit Hilfe des MPR300, der laut Literatur hauptsächlich an der Plasmamembran vorkommt, in die Zellen aufgenommen wird. Aufgrund der Messwerte kann zudem von einer Blockade

der MPRs mittels M6P in allen Zelllinien ausgegangen werden, wobei diese Blockade aufgrund des geringen Anstiegs nach Enzymgabe in den MPR300KO- und MPR46/300_KO-Zellen weniger deutlich erscheint (Abnahme der spezifischen Aktivität der α -Mannosidase um 0,01 mU/mg (MPR300KO: um 11%) bzw. 0,02 mU/mg (MPR46/300_KO: um 28,5 %)), (PS1 +/-: um 84 %, MPR46KO: um 72 %) (Abb. 3.16). Dass die Enzymaktivitäten nach Inkubation im Endozytosemedium mit rhLAMAN und M6P jeweils die endogenen Enzymaktivitäten in allen Zelllinien überschreiten, kann in einer nicht hundertprozentigen Blockade der MPRs mittels M6P oder in einer möglichen anderen, MPR-unabhängigen und damit zudem M6P-Blockade-unabhängigen Aufnahme von rhLAMAN in Zellen begründet sein (Abb. 3.16). Ein Abfall der spezifischen Aktivität von α -Mannosidase unter das Niveau der endogenen Enzymaktivität ist nicht zu erwarten, da in gesunden Zellen lysosomale Enzyme wie die α -Mannosidase intrazellulär bzw. intralysosomal vorkommen.

Da in MPR46/300_KO-Zellen trotz Defizienz an MPR46 und MPR300 eine Zunahme der spezifischen Enzymaktivität der α -Mannosidase nach Inkubation in Endozytosemedium mit 0,1 mg rhLAMAN detektiert werden konnte, wurden weitere Zellversuche mit MPR-doppeldefizienten Zellen in unterschiedlich hoch konzentrierten rhLAMAN-Endozytosemedien durchgeführt, um eine mögliche MPR-unabhängige Enzymaufnahme von rhLAMAN zu überprüfen. Hierbei bestätigte sich diese Aufnahme in MPR46/300_KO-Zellen einerseits durch 4,5-fach erhöhte Messwerte der spezifischen Aktivität von α -Mannosidase nach Applikation von 0,5 mg rhLAMAN mittels Endozytosemedium (Abb. 3.17). Andererseits konnte durch Immunfluoreszenzanalysen sowohl in den Zellen der mit 0,5 mg Enzym behandelten Reihe als auch in den Zellen, die in Endozytosemedium mit 1,0 mg rhLAMAN inkubiert wurden, die Lokalisation von rhLAMAN (grün) in LAMP1 (rot) positiven Vesikeln demonstriert werden (Abb. 3.18). Diese Ko-Lokalisation impliziert den Transport des applizierten Enzyms MPR-unabhängig in die Lysosomen.

Es macht demnach den Anschein, dass bei einer Zugabe von geringeren Dosen rhLAMAN das Enzym in geringen Mengen MPR300-abhängig und nach Applikation höherer Dosen MPR-unabhängig in die Zelle aufgenommen wird. Die in Geweben von an α -Mannosidose erkrankten Mäusen bereits beschriebene, rhLAMAN-dosisabhängige Entspeicherung, vor allem des Gehirns, könnte hiermit begründet sein.

Insgesamt legen die Resultate die Vermutung nahe, dass auch über die Bluthirnschranke ein MPR-unabhängiger Übertritt möglich ist (Blanz u. a., 2008). In Studien am Mausmodell der MPS VII wurde ein besseres Therapieergebnis und damit ein effektiveres Überqueren der Bluthirnschranke bei der Applikation von deglycosylierter β -Glucuronidase im Vergleich zur phosphorylierten Enzymgabe beschrieben (Grubb u. a., 2008). Im Gegensatz dazu wurde bei der Enzymersatztherapie von Mäusen mit Metachromatischer Leukodystrophie eine eindeutige Verbesserung der zentralen Funktion und pathologischen Veränderungen dokumentiert, wobei die applizierte humane Arylsulfatase A stark phosphoryliert vorliegt (Matzner u. a., 2007). Das in den Versuchen dieser Arbeit genutzte rhLAMAN liegt in einer geringgradig phosphorylierten Form vor (Blanz u. a., 2008). Scheinbar sind die Ursachen für die Überwindung der Bluthirnschranke nicht generell sondern individuell krankheitsspezifisch zu betrachten.

Für die Aufnahme der α -Mannosidase in das ZNS kommen neben der möglichen MPR-vermittelten Endozytose (vor allem postnatal) verschiedene andere Transportoptionen in Frage. Es besteht die Möglichkeit, dass rhLAMAN mittels anderer oder bisher noch nicht charakterisierter Rezeptoren die Bluthirnschranke überquert. In MPR-defizienten Mäusen wurde zum Beispiel die Aufnahme von lysosomalen Enzymen mittels Mannose-Rezeptoren und Asialoglycoprotein-Rezeptoren beschrieben (Köster u. a., 1994). Ein Vorkommen dieser Rezeptoren an der Bluthirnschranke ist bisher nicht bekannt. In weiteren Versuchen wäre eine Aufreinigung des Endothels der Bluthirnschranke vorstellbar, um die Expression dieser und anderer Rezeptoren an der Bluthirnschranke zu analysieren. Die Aufnahme von rhLAMAN ins Gehirngewebe in Form von konzentrationsabhängiger Pinozytose oder mittels Phagozytose scheint ebenfalls zu einem gewissen Grad möglich. Da diese Transportformen jedoch verhältnismäßig langsam verlaufen, ist ein solcher solitärer Übertritt eher unwahrscheinlich. Als weitere Alternative für den Übertritt über die Bluthirnschranke von rhLAMAN ist der Zugang über so genannte extrazelluläre Aufnahmewege zu nennen, die in Gehirnarealen ablaufen, die keine bzw. eine weniger dichte Bluthirnschranke aufweisen (Grubb u. a., 2008; Vogler u. a., 2005; Broadwell & Sofroniew, 1993). Hierzu gehören vor allem neurohämale Regionen wie die Zirkumventrikulären Organe (Plexus choroideus, Eminentia media, Area postrema) und große Venen an der Oberfläche der Pia mater und im Subarachnoidalraum, sowie die sensorischen Ganglien der Hirn- und Spinalnerven

und einige Hirnstammregionen wie zum Beispiel der Nucleus tractus solitarius (Broadwell & Banks, 1993). Diese extrazellulären Aufnahmewege ermöglichen Molekülen wie zum Beispiel Serum-Albumin jedoch nur in geringen Mengen den Zugang ins Gehirn (Grubb u. a., 2008; Vogler u. a., 2005; Banks, 2004). Zudem könnte auch eine mögliche Störung der Integrität der Bluthirnschranke und damit eine Verminderung ihrer Barrierefunktion das Erreichen des Gehirns für das venös applizierte Enzym erleichtern.

4.2. Morphologie der Gehirne von α -Mannosidase KO-Mäusen

Um einen chronischen Entzündungsreiz als eine typische Ursache für eine solche Integritätsstörung der Bluthirnschranke in den Gehirnen von α -Mannosidase KO-Mäusen nachzuweisen, wurden Gehirne erkrankter Tiere unter anderem entsprechend auf chronische Entzündungszeichen in Form von aktivierter Mikroglia analysiert (3.5). Die Testung auf aktivierte Mikroglia mittels GSA-Antikörperfärbung implizierte bei gleichmäßiger Ausprägung der Immunfluoreszenzfärbung in KO- und WT-Mäusen das Fehlen von auftretenden Entzündungsreaktionen im Bereich der Hippocampi und Cerebelli (Abb. 3.21). Auch die Analyse des morphologischen Markers MBP zur Klärung der Frage nach einer vorliegenden Demyelinisierung in Gehirnen von α -Mannosidase KO-Mäusen zeigte keine Unterschiede in den Signalstärken bei KO- und WT-Mäusen (Abb. 3.21, Abb. 3.22_D). Eine Demyelinisierung im Gehirn der KO-Mäuse konnte entsprechend nicht nachgewiesen werden (Damme u. a., 2011). Sowohl bei Meerschweinchen als auch bei Katzen, die an α -Mannosidose leiden, ist hingegen eine eindeutige Reduktion des Myelingehalts dokumentiert (Vite u. a., 2001; Crawley & Walkley, 2007).

Bei der weiteren Analyse der cerebralen Morphologie von KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen konnte sowohl in den Aufnahmen der Immunfluoreszenzbilder der Hippocampi und Cerebelli als auch bei der Detektion der Proteinlysate der Gesamtgehirngewebe mittels Immunoblot eine gesteigerte Expression von GFAP in Astrozyten beobachtet werden (Abb. 3.19, Abb. 3.20, Abb. 3.22_C). GFAP bildet ein wesentliches Intermediärfilament in reifen Astrozyten des Zentralnervensystems von Säugetieren und weist zum Beispiel in der Bergmann-Glia der Kleinhirnrinde besonders starke Immunoreaktivität auf. Sowohl beim Menschen als auch bei Nagern lässt sich nachweisen, dass die GFAP-Expression in Astrozyten im Laufe des Lebens langsam zunimmt (Nichols u. a., 1993). Mit dieser Annahme geht die in

dieser Arbeit beobachtete Zunahme der GFAP-Intensität nach Immunfluoreszenzfärbung mit zunehmendem Alter konform. Die gesteigerte Expression von GFAP in Astrozyten ist zudem ein hervorstechendes Kennzeichen der reaktiven Astroglie. Diese zelluläre Reaktion tritt unspezifisch als Folge praktisch jeder Gewebeschädigung im ZNS auf und könnte infektiöser, autoimmuner, ischämischer, traumatischer oder degenerativer Ursache sein. Mittelfristig führt die reaktive Astroglie zur Entstehung einer gliösen Narbe, die vermutlich in den Gehirnen der alten KO-Mäuse angefärbt wurde (Abb. 3.19, Abb. 3.20).

Vor allem der Untergang von Neuronen wird häufig von einer reaktiven Astroglie begleitet (Eng u. a., 2000). Eine Reduktion an NeuN-positiven Neuronen konnte bei diesen Versuchen in den Immunfluoreszenzbildern der Hippocampi und der Kleinhirne allerdings nicht detektiert werden (Abb. 3.19, Abb. 3.20). Die Ergebnisse der Westernblotanalysen der Gesamtproteinlysate der Gehirne hingegen zeigten eine Reduktion der neuronalen Zellkerne, was den Verlust von NeuN-positiven Neuronen in Gehirnen der KO-Mäuse impliziert (Abb. 3.22_A). Neben diesen Beobachtungen beschrieben auch Damme u.a. 2011 nach spezifischen Untersuchungen von Kleinhirnen von α -Mannosidase KO-Mäusen den Verlust von Purkinje-Zellen, was als Ursache einer reaktiven Astroglie vor allem in der Bergmann-Glia proklamiert wird (Damme u. a., 2011). Die Untersuchung der ZNS-Pathologie von an α -Mannosidose erkrankten Meerschweinchen zeigte ebenfalls eine detektierbare Astroglie und eine neuroaxonale Dystrophie inklusive des Verlusts an Neuronen vor allem von Purkinje-Zellen im Bereich der Kleinhirne (Crawley & Walkley, 2007). Entsprechend ist insgesamt eine Astroglie in den Gehirnen der α -Mannosidase KO-Mäuse wahrscheinlich, die reaktiv auf den Untergang von Neuronen erfolgt.

Ein zusätzlich entzündlicher Aspekt der Astroglie kann zudem nicht ausgeschlossen werden, wenn auch in dieser Arbeit kein Hinweis auf Entzündungsreaktionen im Bereich der Hippocampi und Cerebelli vorliegt. Da jedoch sowohl Färbungen anderer Marker neben GSA für Mikroglia aufgrund von Verfahrensfehlern nicht auswertbar waren und in Kleinhirnen von KO-Mäusen aktivierte Mikroglia als auch in Gehirnen von an α -Mannosidose erkrankten Meerschweinchen eine Zunahme dieser aktivierten Mikroglia beschrieben wurde (Damme u. a., 2011; Crawley & Walkley, 2007), kann ein entzündlicher Aspekt der Astroglie und letztlich auch eine potentielle Veränderung der Barrierefunktion der Bluthirnschranke

aufgrund einer leichten Entzündungsreaktion nicht ausgeschlossen werden. Dennoch ist eher anzunehmen, dass rhLAMAN die Überquerung der Bluthirnschranke und den Zugang in das Gehirngewebe mit Hilfe eines bisher unbekannten Mechanismus erreicht.

Eine mögliche iatrogene Störung der Bluthirnschrankenintegrität durch zum Beispiel Infektion mit Meningitiden auslösenden Bakterien oder Viren oder durch Induktion einer endogenen Immunreaktion durch intracerebrale Antigenapplikation wären theoretisch zur Steigerung der Durchlässigkeit der Bluthirnschranke möglich, aufgrund des hohen Risikopotentials für schwerwiegende klinische Symptome inklusive Folgeschäden an Patienten jedoch nicht praktikabel. Neben der intravenösen Enzymsubstitution könnten zum Erreichen des Gehirngewebes alternative Verfahren wie die direkte intrathecale bzw. die intraventrikuläre Enzymapplikation zum Einsatz kommen (Chen u. a., 2011; Dickson & Chen, 2011; Jolly u. a., 2011; Enns & Huhn, 2008).

4.3. Therapiemodell

Wenn auch die Umstände und die Ursache der erfolgreichen zentralen Entspeicherung bei der Enzymersatztherapie mit rhLAMAN lediglich richtungsweisend erklärt werden konnten, so wurde dennoch der einschlägige Effekt genutzt, um im Rahmen eines Langzeitexperiments die Wirksamkeit der Substitution in einem eher am Patienten orientierten Modell zu überprüfen. Hierbei wurde rhLAMAN wie bei bisher zugelassenen Enzymersatztherapien alle 14 Tage intravenös verabreicht. Aufgrund immenser Immunreaktionen in Form von Antikörperbildung auf das artfremde rhLAMAN, die vermutlich ursächlich für den Tod von 9 von 14 behandelten KO-Mäusen war (Abb. 3.8, Abb. 3.9), musste das Langzeitexperiment vorzeitig nach 16 Wochen abgebrochen werden. Eine spezifische humorale Immunreaktion im Rahmen der Enzymersatztherapie mit dem für Mäuse artfremden rhLAMAN kam an sich nicht überraschend. Sowohl in α -Mannosidase KO-Mäusen als auch in an α -Mannosidose erkrankten Meerschweinchen wurde eine Antikörperbildung bereits nach wenigen Applikationen von rekombinanter humaner lysosomaler α -Mannosidase dokumentiert (Abb. 3.7) (Crawley u. a., 2006; Roces 2005). Zudem zeigen sogar Patienten Lysosomaler Speichererkrankungen, die mit rekombinanten humanen, also artgerechten Enzymen behandelt werden, erhöhte Antikörpertiter (Kishnani u. a., 2007; Brady, 2006; Linthorst u. a., 2004).

Aus den Ergebnissen der Immunreaktionen der substituierten KO-Mäuse in dieser Arbeit konnte ein dosisabhängiger Beginn der Immunreaktion abgeleitet werden. Die mit 25 mU/mg KG Enzym behandelten KO-Mäuse zeigten nach der zweiten Injektion, die KO-Mäuse, denen 500 mU/mg KG rhLAMAN appliziert wurden, nach der ersten Injektion einen signifikanten Anstieg der Antikörperkonzentration gegen das zugeführte artfremde rhLAMAN (Abb. 3.9). Die Ausbildung einer Immuntoleranz in Form eines Konzentrationsrückgangs des Antikörpertiters, wie sie bei enzym-substituierten Patienten mit Morbus Gaucher und MPS I, II und VI beschrieben wurde (Beck, 2010; Rosenberg u. a., 1999; Richards u. a., 1993), konnte vermutlich auch aufgrund des artfremden Substituats nicht verzeichnet werden.

Da eine Enzymgabe von 500 mU/mg KG zur effektiven Entspeicherung der zentralen Gewebe notwendig ist (Blanz u. a., 2008), würde ein weiterer Langzeittherapieversuch als Therapiemodell über einen noch längeren Zeitraum mit kürzeren Injektionsintervallen, bei dem durch Summation des Substitutionseffektes eine Entspeicherung des Gehirngewebes wie in peripheren Geweben auf WT-Niveau möglich wäre, aufgrund der hohen Mortalitätsrate erneut an Grenzen stoßen. Auch die Auswertung von Veränderungen der cerebellären Ataxie und von kognitiven Verhaltensauffälligkeiten der KO-Mäuse nach langfristiger, kontinuierlicher Enzymsubstitution könnte durch die massive Immunreaktion limitiert werden. Um diesen Umstand zu überwinden standen zwei Optionen zur Verfügung. Zum Einen wäre ein frühzeitiger Therapiebeginn direkt nach der Geburt zu wählen um die Immunreaktion möglichst gering zu halten, wie bereits in einem Katzenmodell der MPS VI gezeigt wurde (Auclair u. a., 2003). Zum Anderen bestand die Möglichkeit der genetischen Manipulation der α -Mannosidase KO-Mäuse, so dass das Immunsystem dieser Mäuse rhLAMAN als arteigenes Enzym erkennen und es damit nicht zu einer intensiven humoralen Immunreaktion kommen würde und die Bildung einer Immuntoleranz im Verlauf möglich wäre.

Ein vergleichbares Prozedere wurde bereits 2007 im Mausmodell der Metachromatischen Leukodystrophie durchgeführt. Hierbei wurden immuntolerante Mäuse gegenüber humanen Arylsulfatase A generiert (Matzner u. a., 2007). Die Generation dieser transgenen (tg) α -Mannosidase KO-Mäuse und der Beginn des biochemischen Vergleichs mit den bisher genutzten KO-Mäusen erfolgten zum zeitlichen Ende des experimentellen Anteils dieser Arbeit. Aufgrund lediglich kurzzeitiger Involvierung wurden erste Ergebnisse in diese Arbeit nicht integriert.

Angestrebt wird eine hochfrequente Enzymersatztherapie mit tg-KO-Mäusen um zu überprüfen, ob langfristig eine effektive und aufgrund von Aufsättigungseffekten eine vollständige Entspeicherung des ZNS möglich ist. Auf die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse des Langzeittherapieversuchs (s. 3.2.2, Abb. 3.10) aufbauend wäre ein Injektionsprotokoll von je mindestens 500 mU/mg KG in einem geringer als 14-tägigen Injektionsintervall zu empfehlen. Hieran wird weiter in der Arbeitsgruppe Saftig/ Blanz des Biochemischen Instituts der Medizinischen Fakultät der CAU zu Kiel im Rahmen des von der EU finanzierten ALPHA-MAN-Projekts geforscht, dem dritten von der EU finanzierten Projekt nach dem EURAMAN- und dem HUE-MAN-Projekt zur Erforschung von Therapieoptionen der seltenen Lysosomalen Speichererkrankung α -Mannosidose. Zusätzlich werden im Rahmen dieses ALPHA-MAN-Projekts erste klinische Studien aufbauend auf Ergebnisse des HUE-MAN-Projekts, in dessen Rahmen diese Arbeit absolviert wurde, durchgeführt. Einerseits fand von Oktober 2010 bis Januar 2011 eine Phase-1-Studie zur Klärung des Sicherheitsprofils von rhLAMAN für Patienten, dem LamazymTM, statt, andererseits erfolgte ab Januar 2011 eine Phase-2-Studie zur Evaluation klinisch eindeutiger Endpunkte sowie zur Dosisfindung für die Enzymersatztherapie für Patienten mit α -Mannosidose. Nachdem in dem ersten Teilbereich der Phase-2-Studie (2a) demonstriert werden konnte, dass LamazymTM klinisch gemessen effektiv, sicher und gut verträglich ist, wurden von Januar 2012 an im Rahmen der 2b-Phase neun Patienten für sechs Monate mit LamazymTM wöchentlich intravenös substituiert. Ziel war es sowohl die gewählte Enzymdosis von 1 mg/kg KG als auch erneut deren klinische Effektivität zu bestätigen (<http://www.zymenex.com>). Neueste Ergebnisse sind auf dem Internetportal <http://www.alpha-man.eu> nachzulesen.

5. Zusammenfassung

α -Mannosidose ist eine seltene, derzeit nicht kurativ behandelbare Lysosomale Speichererkrankung mit einem klinisch heterogenen Erscheinungsbild. Aufgrund einer genetisch bedingten Enzymdefizienz an lysosomaler α -Mannosidase kommt es zur intralysosomalen Akkumulation von mannosehaltigen Oligosacchariden in Zellen peripherer und zentraler Gewebe, wobei diese Ablagerungen organbezogene funktionelle Einschränkungen unterschiedlicher Ausprägungsgrade zur Folge hat. Als potentielle Therapieoption für α -Mannosidose gilt die Enzymersatztherapie. Dieser Umstand liegt darin begründet, dass eine intravenös applizierte Enzymsubstitution mittels rekombinanter humaner lysosomaler α -Mannosidase im Mausmodell zu einer effektiven Entspeicherung in den peripheren und zudem in den zentralen Geweben führt. Diese Therapieoption wurde zu Beginn dieser Arbeit ausschließlich an Tiermodellen durchgeführt und wird derzeit bereits im Rahmen von Zulassungsstudien an Patienten überprüft.

In dieser Arbeit konnte im Mausmodell eine Reduktion der Akkumulation von krankheitstypischem Speichermaterial nach vier Enzymgaben von je 500 mU/mg Körpergewicht von über 70 % sowohl in den peripheren Geweben als auch im Zentralnervensystem nachgewiesen werden. Eine Langzeittherapie ähnlich eines für Patienten entsprechenden Schemas musste aufgrund von infausten Immunreaktionen der Versuchstiere auf das injizierte, artfremde Protein vorzeitig eingestellt werden. Kommende Versuchsreihen mit transgenen Knock-out-Mäusen, deren Immunsystem das applizierte Enzym als arteigen anerkennt, werden diese Hürde überwinden.

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass applizierte, rekombinante humane lysosomale α -Mannosidase neben der für lysosomale Enzyme typischen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-abhängigen Endozytose auch unabhängig von diesen Rezeptoren in Zellen aufgenommen wird. Dies stimmt mit dem geringen Phosphorylierungsgrad des substituierten Enzyms überein. Vermutlich erfolgt über diesen, noch unbekannten Weg ebenfalls die Aufnahme des peripher applizierten Enzyms in das Zentralnervensystem über die Bluthirnschranke. Ein potentiell die Querung der Bluthirnschranke erleichternder Aspekt in Form einer Störung der Schrankenintegrität aufgrund inflammatorischer Prozesse im Gehirngewebe konnte mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten morphologischen Analysen von Gehirnen erkrankter,

unbehandelter Mäuse nicht ausgeschlossen werden. Bei diesen morphologischen Analysen wurden zudem erstmals eine reaktive Astroglie, eine Reduktion von Neuronen sowie keine Demyelinisierung in den Gehirnen der erkrankten, unbehandelten Mäuse erfasst.

Aufbauend auf Ergebnissen dieser Arbeit und weiteren Forschungen im Rahmen des HUE-MAN-Projekts werden seit Oktober 2010 klinische Studien zur Enzyersatztherapie mit rekombinanter humaner lysosomaler α -Mannosidase an Patienten mit α -Mannosidose durchgeführt. Deren Resultate zeigten jüngst, dass die Enzymsubstitution klinisch gemessen effektiv, sicher und gut verträglich ist. Eine Therapie gegen die sich auch in zentralen Geweben manifestierende lysosomale Speichererkrankung α -Mannosidose scheint derzeit mittels Enzyersatz möglich.

6. Literaturverzeichnis

- Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R. & Begley, D.J. (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37 (1), S.13-25.
- Albert, M.H., Schuster, F., Peters, C., Schulze, S., Pontz, B.F., Muntau, A.C., Röschinger, W., Stachel, D.K., Enders, A., Haas, R.J. & Schmid, I. (2003) T-cell-depleted peripheral blood stem cell transplantation for alpha-mannosidosis. *Bone Marrow Transplantation*, 32 (4), S.443-446.
- Arvidson, B. (1979) Distribution of intravenously injected protein tracers in peripheral ganglia of adult mice. *Experimental Neurology*, 63 (2), S.388-410.
- Auclair, D., Hopwood, J.J., Brooks, D. A., Lemontt, J.F. & Crawley, A.C. (2003) Replacement therapy in Mucopolysaccharidosis type VI: advantages of early onset of therapy. *Molecular Genetics and Metabolism*, 78 (3), S.163-174.
- Auclair, D. & Hopwood, J. J. (2007) Morphopathological features in tissues of alpha-mannosidosis guinea pigs at different gestational ages. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 33 (5), S.572-585.
- Autio, S., Louhimo, T. & Helenius, M. (1982) The clinical course of mannosidosis. *Annals of Clinical Research*, 14 (2), S.93-97.
- Ballabio, A. & Gieselmann, V. (2009) Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1793 (4), S.684-696.
- Banikazemi, M., Bultas, J., Waldek, S., Wilcox, W.R., Whitley, C.B., McDonald, Marie, Finkel, R., Packman, S., Bichet, D.G., Warnock, D.G. & Desnick, Robert J (2007) Agalsidase-beta therapy for advanced Fabry disease: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 146 (2), S.77-86.
- Banks, W.A. (2004) Are the extracellular [correction of extracellular] pathways a conduit for the delivery of therapeutics to the brain? *Current Pharmaceutical Design*, 10 (12), S.1365-1370.
- Barton, N.W., Brady, R O & Dambrosia, J.M. (1993) Treatment of Gaucher's disease. *The New England Journal of Medicine*, 328 (21), S.1564-1565; author reply 1567-1568.
- Beck, M. (2007) New therapeutic options for lysosomal storage disorders: enzyme replacement, small molecules and gene therapy. *Human Genetics*, 121 (1), S.1-22.
- Beck, M. (2009) Agalsidase alfa for the treatment of Fabry disease: new data on clinical efficacy and safety. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9 (2), S.255-261.
- Beck, M. (2010) Therapy for lysosomal storage disorders. *IUBMB Life*, 62 (1), S.33-40.

- Begley, D.J., Pontikis, C.C. & Scarpa, M. (2008) Lysosomal storage diseases and the blood-brain barrier. *Current Pharmaceutical Design*, 14 (16), S.1566-1580.
- Bennet, J.K., Dembure, P.P. & Elsas, L.J. (1995) Clinical and biochemical analysis of two families with type I and type II mannosidosis. *American Journal of Medical Genetics*, 55 (1), S.21-26.
- Berg, T., Riise, H.M., Hansen, G.M., Malm, D., Tranebjaerg, L., Tollersrud, O.K. & Nilssen, O. (1999) Spectrum of mutations in alpha-mannosidosis. *American Journal of Human Genetics*, 64 (1), S.77-88.
- Blanz, J., Stroobants, S., Lüllmann-Rauch, Renate, Morelle, W., Lüdemann, M., D'Hooge, R., Reuterwall, H., Michalski, J.C., Fogh, J., Andersson, C. & Saftig, Paul (2008) Reversal of peripheral and central neural storage and ataxia after recombinant enzyme replacement therapy in alpha-mannosidosis mice. *Human Molecular Genetics*, 17 (22), S.3437-3445.
- Boado, R.J., Zhang, Yufeng, Zhang, Yun & Pardridge, W.M. (2007) Humanization of anti-human insulin receptor antibody for drug targeting across the human blood-brain barrier. *Biotechnology and Bioengineering*, 96 (2), S.381-391.
- Brady, R.O. (2006) Enzyme replacement for lysosomal diseases. *Annual Review of Medicine*, 57, S.283-296.
- Braulke, T. & Bonifacino, J.S. (2009) Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1793 (4), S.605-614.
- Broadwell, R.D. & Banks, W.A. (1993) Cell biological perspective for the transcytosis of peptides and proteins through the mammalian blood-brain fluid barriers. In: *The Blood-Brain Barrier* (Pardridge W.M.) S.165-199, Raven Press, Ltd, New York.
- Broadwell, R.D. & Sofroniew, M.V. (1993) Serum proteins bypass the blood-brain fluid barriers for extracellular entry to the central nervous system. *Experimental Neurology*, 120 (2), S.245-263.
- Brown, W.J., Goodhouse, J. & Farquhar, M.G. (1986) Mannose-6-phosphate receptors for lysosomal enzymes cycle between the Golgi complex and endosomes. *The Journal of Cell Biology*, 103 (4), S.1235-1247.
- Burditt, L.J., Chotai, K., Hirani, S., Nugent, P.G., Winchester, B.G. & Blakemore, W.F. (1980) Biochemical studies on a case of feline mannosidosis. *The Biochemical Journal*, 189 (3), S.467-473.
- Caeyenberghs, K., Balschun, D., Rocas, D.P., Schwake, M., Saftig, Paul & D'Hooge, R. (2006) Multivariate neurocognitive and emotional profile of a mannosidosis murine model for therapy assessment. *Neurobiology of Disease*, 23 (2), S.422-432.

- Cartier, N. & Aubourg, P. (2008) Hematopoietic stem cell gene therapy in Hurler syndrome, globoid cell leukodystrophy, metachromatic leukodystrophy and X-adrenoleukodystrophy. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 10 (5), S.471-478.
- Castaneda, J.A., Lim, M.J., Cooper, J.D. & Pearce, D.A. (2008) Immune system irregularities in lysosomal storage disorders. *Acta Neuropathologica*, 115 (2), S.159-174.
- Chen, A., Vogler, C., McEntee, M., Hanson, S., Ellinwood, N.M., Jens, J., Snella, E., Passage, M., Le, S., Guerra, C. & Dickson, P. (2011) Glycosaminoglycan storage in neuroanatomical regions of mucopolysaccharidosis I dogs following intrathecal recombinant human iduronidase. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica*, 119 (8), S.513-521.
- Clarke, L.A., Wraith, J Edmond, Beck, Michael, Kolodny, E.H., Pastores, Gregory M, Muenzer, J., Rapoport, D.M., Berger, K.I., Sidman, M., Kakkis, E.D. & Cox, G.F. (2009) Long-term efficacy and safety of laronidase in the treatment of mucopolysaccharidosis I. *Pediatrics*, 123 (1), S.229-240.
- Conus, S. & Simon, H.-U. (2008) Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochemical Pharmacology*, 76 (11), S.1374-1382.
- Cox, T.M., Lachmann, R., Hollak, C., Aerts, J., van Weely, S., Hrebícek, M., Platt, F., Butters, T., Dwek, R., Moyses, C., Gow, I., Elstein, D. & Zimran, A. (2000) Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet*, 355 (9214), S.1481-1485.
- Cox, T.M. , Aerts, J.M.F.G., Andria, G., Beck, M., Belmatoug, N., Bembi, B., Chertkoff, R., Vom Dahl, S., Elstein, D., Erikson, A., Giralt, M., Heitner, R., Hollak, C., Hrebicek, M., Lewis, S., Mehta, A., Pastores, G.M., Rolfs, A., Miranda, M.C. Sa & Zimran, A. (2003) The role of the iminosugar N-butyldeoxynojirimycin (miglustat) in the management of type I (non-neuronopathic) Gaucher disease: a position statement. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 26 (6), S.513-526.
- Cox, T.M. (2010) Gaucher disease: clinical profile and therapeutic developments. *Biologics: Targets & Therapy*, 4, S.299-313.
- Crawley, A.C., Jones, M.Z., Bonning, L.E., Finnie, J.W. & Hopwood, J.J. (1999) Alpha-mannosidosis in the guinea pig: a new animal model for lysosomal storage disorders. *Pediatric Research*, 46 (5), S.501-509.
- Crawley, A.C., King, B., Berg, T., Meikle, P.J. & Hopwood, J.J. (2006) Enzyme replacement therapy in alpha-mannosidosis guinea-pigs. *Molecular Genetics and Metabolism*, 89 (1-2), S.48-57.
- Crawley, A.C. & Walkley, S.U. (2007) Developmental analysis of CNS pathology in the lysosomal storage disease alpha-mannosidosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 66 (8), S.687-697.

- D'Hooge, R., Lüllmann-Rauch, R., Beckers, T., Balschun, D., Schwake, M., Reiss, K., von Figura, K. & Saftig, P. (2005) Neurocognitive and psychotiform behavioral alterations and enhanced hippocampal long-term potentiation in transgenic mice displaying neuropathological features of human alpha-mannosidosis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25 (28), S.6539-6549.
- al Daher, S., de Gasperi, R., Daniel, P., Hall, N., Warren, C.D. & Winchester, B. (1991) The substrate-specificity of human lysosomal alpha-D-mannosidase in relation to genetic alpha-mannosidosis. *The Biochemical Journal*, 277 (Pt 3), S.743-751.
- Damme, M., Stroobants, S., Walkley, S.U., Lüllmann-Rauch, R., D'Hooge, R., Fogh, J., Saftig, P., Lübke, T. & Blanz, J. (2011) Cerebellar alterations and gait defects as therapeutic outcome measures for enzyme replacement therapy in α -mannosidosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 70 (1), S.83-94.
- Desnick, R.J. & Schuchman, E.H. (2002) Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders. *Nature Reviews. Genetics*, 3 (12), S.954-966.
- Desnick, R.J. (2004) Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 27 (3), S.385-410.
- Dickson, P.I. & Chen, A.H. (2011) Intrathecal enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: translating success in animal models to patients. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12 (6), S.946-955.
- Dunder, U., Kaartinen, V., Valtonen, P., Väänänen, E., Kosma, V.M., Heisterkamp, N., Groffen, J. & Mononen, I. (2000) Enzyme replacement therapy in a mouse model of aspartylglycosaminuria. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14 (2), S.361-367.
- Dunder, U., Valtonen, P., Kelo, E. & Mononen, I. (2010) Early initiation of enzyme replacement therapy improves metabolic correction in the brain tissue of aspartylglycosaminuria mice. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33 (5), S.611-617.
- De Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. & Appelmans, F. (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *The Biochemical Journal*, 60 (4), S.604-617.
- Eng, L.F., Ghirnikar, R.S. & Lee, Y.L. (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical Research*, 25 (9-10), S.1439-1451.
- Enns, G.M. & Huhn, S.L. (2008) Central nervous system therapy for lysosomal storage disorders. *Neurosurgical Focus*, 24 (3-4), S.E12.

- von Figura, K. & Hasilik, A. (1986) Lysosomal enzymes and their receptors. *Annual Review of Biochemistry*, 55, S.167-193.
- Fratantoni, J.C., Hall, C.W. & Neufeld, E.F. (1968) Hurler and Hunter syndromes: mutual correction of the defect in cultured fibroblasts. *Science (New York, N.Y.)*, 162 (853), S.570-572.
- Futerman, A.H. & van Meer, G. (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5 (7), S.554-565.
- Ghosh, P., Dahms, N.M. & Kornfeld, S. (2003) Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4 (3), S.202-212.
- Gliddon, B.L. & Hopwood, J.J. (2004) Enzyme-replacement therapy from birth delays the development of behavior and learning problems in mucopolysaccharidosis type IIIA mice. *Pediatric Research*, 56 (1), S.65-72.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., Anderson, R.G., Russell, D.W. & Schneider, W.J. (1985) Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annual Review of Cell Biology*, 1, S.1-39.
- Gonzalez-Noriega, A., Grubb, J.H., Talkad, V. & Sly, W.S. (1980) Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. *The Journal of Cell Biology*, 85 (3), S.839-852.
- Grabowski, G.A. & Hopkin, R.J. (2003) Enzyme therapy for lysosomal storage disease: principles, practice, and prospects. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 4, S.403-436.
- Grewal, S.S., Shapiro, E.G., Krivit, W., Charnas, L., Lockman, L.A., Delaney, K.A., Davies, S.M., Wenger, D.A., Rimell, F.L., Abel, S., Grovas, A.C., Orchard, P.J., Wagner, J.E. & Peters, C. (2004) Effective treatment of alpha-mannosidosis by allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *The Journal of Pediatrics*, 144 (5), S.569-573.
- Grubb, J.H., Vogler, C., Levy, B., Galvin, N., Tan, Y. & Sly, W.S. (2008) Chemically modified beta-glucuronidase crosses blood-brain barrier and clears neuronal storage in murine mucopolysaccharidosis VII. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (7), S.2616-2621.
- Gutschalk, A., Harting, I., Cantz, M., Springer, C., Rohrschneider, K. & Meinck, H.-M. (2004) Adult alpha-mannosidosis: clinical progression in the absence of demyelination. *Neurology*, 63 (9), S.1744-1746.
- Harmatz, P., Yu, Z.-F., Giugliani, R., Schwartz, I.V.D., Guffon, N., Teles, E.L., Miranda, M.C.S., Wraith, J.E., Beck, M., Arash, L., Scarpa, M., Ketteridge, D., Hopwood, J.J., Plecko, B., Steiner, R., Whitley, C.B., Kaplan, P., Swiedler, S.J., Hardy, K., Berger, K.I. & Decker, C. (2010) Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: evaluation of long-term pulmonary function in patients treated with recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33 (1), S.51-60.

- Hermann, D.M. & Bassetti, C.L. (2007) Implications of ATP-binding cassette transporters for brain pharmacotherapies. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28 (3), S.128-134.
- Hervé, F., Ghinea, N. & Scherrmann, J.-M. (2008) CNS delivery via adsorptive transcytosis. *The AAPS Journal*, 10 (3), S.455-472.
- Hickman, S. & Neufeld, E.F. (1972) A hypothesis for I-cell disease: defective hydrolases that do not enter lysosomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 49 (4), S.992-999.
- Hobbs, J.R., Hugh-Jones, K., Barrett, A.J., Byrom, N., Chambers, D., Henry, K., James, D.C., Lucas, C.F., Rogers, T.R., Benson, P.F., Tansley, L.R., Patrick, A.D., Mossman, J. & Young, E.P. (1981) Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet*, 2 (8249), S.709-712.
- Hocking, J.D., Jolly, R.D. & Batt, R.D. (1972) Deficiency of alpha-mannosidase in Angus cattle. An inherited lysosomal storage disease. *The Biochemical Journal*, 128 (1), S.69-78.
- Hoffmann, B., Schulze-Frenking, G., Al-Sawaf, S., Beck, M. & Mayatepek, E. (2011) Hunter disease before and during enzyme replacement therapy. *Pediatric Neurology*, 45 (3), S.181-184.
- Hunziker, W. & Geuze, H.J. (1996) Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 18 (5), S.379-389.
- Hwu, W.-L., Chien, Y.-H. & Lee, N.-C. (2010) Newborn screening for neuropathic lysosomal storage disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33 (4), S.381-386.
- Jeyakumar, M., Dwek, Raymond A., Butters, Terry D. & Platt, F.M. (2005) Storage solutions: treating lysosomal disorders of the brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6 (9), S.713-725.
- Jolly, R.D., Marshall, N.R., Perrott, M.R., Dittmer, K.E., Hemsley, K.M. & Beard, H. (2011) Intracisternal enzyme replacement therapy in lysosomal storage diseases: routes of absorption into brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 37 (4), S.414-422.
- Kaartinen, V., Mononen, I., Voncken, J.W., Noronkoski, T., Gonzalez-Gomez, I., Heisterkamp, N. & Groffen, J. (1996) A mouse model for the human lysosomal disease aspartylglycosaminuria. *Nature Medicine*, 2 (12), S.1375-1378.
- Kaneda, Y., Hayes, H., Uchida, T., Yoshida, M.C. & Okada, Y. (1987) Regional assignment of five genes on human chromosome 19. *Chromosoma*, 95 (1), S.8-12.

- Karageorgos, L., Brooks, D.A., Harmatz, P., Ketteridge, D., Pollard, A., Melville, E.L., Parkinson-Lawrence, E., Clements, P.R. & Hopwood, J.J. (2007) Mutational analysis of mucopolysaccharidosis type VI patients undergoing a phase II trial of enzyme replacement therapy. *Molecular Genetics and Metabolism*, 90 (2), S.164-170.
- Kishnani, P.S., Corzo, D., Nicolino, M., Byrne, B., Mandel, H., Hwu, W.L., Leslie, N., Levine, J., Spencer, C., McDonald, M., Li, J., Dumontier, J., Halberthal, M., Chien, Y.H., Hopkin, R., Vijayaraghavan, S., Gruskin, D., Bartholomew, D., van der Ploeg, A., Clancy, J.P., Parini, R., Morin, G., Beck, M., De la Gastine, G.S., Jokic, M., Thurberg, B., Richards, S., Bali, D., Davison, M., Worden, M.A., Chen, Y.T. & Wraith, J.E. (2007) Recombinant human acid [alpha]-glucosidase: major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. *Neurology*, 68 (2), S.99-109.
- Klumperman, J., Hille, A., Veenendaal, T., Oorschot, V., Stoorvogel, W., von Figura, K. & Geuze, H.J. (1993) Differences in the endosomal distributions of the two mannose 6-phosphate receptors. *The Journal of Cell Biology*, 121 (5), S.997-1010.
- Kornfeld, S. & Mellman, I. (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annual Review of Cell Biology*, 5, S.483-525.
- Köster, A., von Figura, K. & Pohlmann, R. (1994) Mistargeting of lysosomal enzymes in M(r) 46,000 mannose 6-phosphate receptor-deficient mice is compensated by carbohydrate-specific endocytotic receptors. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 224 (2), S.685-689.
- Krivit, W. (2004) Allogeneic stem cell transplantation for the treatment of lysosomal and peroxisomal metabolic diseases. *Springer Seminars in Immunopathology*, 26 (1-2), S.119-132.
- Lebowitz, J.H. (2005) A breach in the blood-brain barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (41), S.14485-14486.
- Linthorst, G.E., Hollak, C.E.M., Donker-Koopman, W.E., Strijland, A. & Aerts, Johannes M.F.G. (2004) Enzyme therapy for Fabry disease: neutralizing antibodies toward agalsidase alpha and beta. *Kidney International*, 66 (4), S.1589-1595.
- Liu, X., Tu, M., Kelly, R.S., Chen, C. & Smith, B.J. (2004) Development of a computational approach to predict blood-brain barrier permeability. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 32 (1), S.132-139.
- Lloyd, J.B. (1996) The taxonomy of lysosomes and related structures. *Sub-Cellular Biochemistry*, 27, S.1-13.
- Lüllmann-Rauch, R. (2006) *Histologie. Verstehen - Lernen - Nachschlagen*. 2. Aufl. Thieme, Stuttgart.

- Luzio, J.P., Poupon, V., Lindsay, M.R., Mullock, B.M., Piper, R.C. & Pryor, P.R. (2003) Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes. *Molecular Membrane Biology*, 20 (2), S.141-154.
- Malm, D. & Nilssen, O. (2008) Alpha-mannosidosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 3, S.21.
- Mancini, G.M., Havelaar, A.C. & Verheijen, F.W. (2000) Lysosomal transport disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 23 (3), S.278-292.
- Masson, C., Cissé, I., Simon, V., Insalaco, P. & Audran, M. (2004) Fabry disease: a review. *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme*, 71 (5), S.381-383.
- Matern, D. (2008) Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992). Supplement*, 97 (457), S.33-37.
- Matzner, U., Herbst, E., Hedayati, K.K., Lüllmann-Rauch, R., Wessig, C., Schröder, S., Eistrup, C., Möller, C., Fogh, J. & Gieselmann, V. (2005) Enzyme replacement improves nervous system pathology and function in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. *Human Molecular Genetics*, 14 (9), S.1139-1152.
- Matzner, U., Matthes, F., Herbst, E., Lüllmann-Rauch, R., Callaerts-Vegh, Z., D'Hooze, R., Weigelt, C., Eistrup, C., Fogh, J. & Gieselmann, V. (2007) Induction of tolerance to human arylsulfatase A in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 13 (9-10), S.471-479.
- Mehta, A.B., Beck, M. & Sunder-Plassmann, G. (2006) *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford PharmaGenesis Ltd.
- Meikle, P.J., Hopwood, J.J., Clague, A.E. & Carey, W.F. (1999) Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 281 (3), S.249-254.
- Meikle, P.J., Ranieri, E., Simonsen, H., Rozaklis, T., Ramsay, S., Fuller, M., Christensen, E., Skovby, F. & Hopwood, J.J. (2004) Newborn screening for lysosomal storage disorders: clinical evaluation of a two-tier strategy. *Pediatrics*, 114 (4), S.909-916.
- Mortimore, G.E., Miotto, G., Venerando, R. & Kadowaki, M. (1996) Autophagy. *Sub-Cellular Biochemistry*, 27, S.93-135.
- Munier-Lehmann, H., Mauxion, F., Bauer, U., Lobel, P. & Hoflack, B. (1996) Re-expression of the mannose 6-phosphate receptors in receptor-deficient fibroblasts. Complementary function of the two mannose 6-phosphate receptors in lysosomal enzyme targeting. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (25), S.15166-15174.
- Nakamura, K., Hattori, K. & Endo, F. (2011) Newborn screening for lysosomal storage disorders. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, 157 (1), S.63-71.

- Neufeld, E.F. (1980) The uptake of enzymes into lysosomes: an overview. *Birth Defects Original Article Series*, 16 (1), S.77-84.
- Nichols, N.R., Day, J.R., Laping, N.J., Johnson, S.A. & Finch, C.E. (1993) GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiology of Aging*, 14 (5), S.421-429.
- Nicolino, M., Byrne, B., Wraith, J.E., Leslie, N., Mandel, H., Freyer, D.R., Arnold, G.L., Pivnick, E.K., Ottinger, C.J., Robinson, P.H., Loo, J.-C.A., Smitka, M., Jardine, P., Tatò, L., Chabrol, B., McCandless, S., Kimura, S., Mehta, L., Bali, D., Skrinar, A., Morgan, C., Rangachari, L., Corzo, D. & Kishnani, P.S. (2009) Clinical outcomes after long-term treatment with alglucosidase alfa in infants and children with advanced Pompe disease. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 11 (3), S.210-219.
- Nielsen, F.C., Wang, E. & Gammeltoft, S. (1991) Receptor binding, endocytosis, and mitogenesis of insulin-like growth factors I and II in fetal rat brain neurons. *Journal of Neurochemistry*, 56 (1), S.12-21.
- Niemann, S., Beck, M., Seidel, G., Spranger, J. & Vieregge, P. (1996) Neurology of adult alpha-mannosidosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 61 (1), S.116-117.
- Nilssen, O., Berg, T., Riise, H.M., Ramachandran, U., Evjen, G., Hansen, G.M., Malm, D., Tranebjaerg, L. & Tollersrud, O.K. (1997) alpha-Mannosidosis: functional cloning of the lysosomal alpha-mannosidase cDNA and identification of a mutation in two affected siblings. *Human Molecular Genetics*, 6 (5), S.717-726.
- Nilssen, O., Stensland, H.M.F.R. & Malm, D. (2011) Clinical utility gene card for: α -mannosidosis. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 19 (7).
- O'Brien, J.S., Miller, A.L., Loverde, A.W. & Veath, M.L. (1973) Sanfilippo disease type B: enzyme replacement and metabolic correction in cultured fibroblasts. *Science (New York, N.Y.)*, 181 (101), S.753-755.
- Öckerman, P.A. (1967) A generalized storage disorder resembling Hurler's syndrome. *Lancet*, 2, 239-241
- Pardridge, W.M. (2007) Blood-brain barrier delivery. *Drug Discovery Today*, 12 (1-2), S.54-61.
- Patterson, M.C., Vecchio, D., Prady, H., Abel, L. & Wraith, J.E. (2007) Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *Lancet Neurology*, 6 (9), S.765-772.
- Peters, C. & Steward, C.G. (2003) Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: an overview of outcomes and practice guidelines. *Bone Marrow Transplantation*, 31 (4), S.229-239.

- Platt, F.M., Neises, G.R., Dwek, R.A. & Butters, T.D. (1994) N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 269 (11), S.8362-8365.
- Pohlmann, R., Hasilik, A., Cheng, S., Pemble, S., Winchester, B. & von Figura, K. (1983) Synthesis of lysosomal alpha-mannosidase in normal and mannosidosis fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 115 (3), S.1083-1089.
- Pohlmann, R., Boeker, M.W. & von Figura, K. (1995) The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (45), S.27311-27318.
- Porter, M.T., Fluharty, A.L. & Kihara, H. (1971) Correction of abnormal cerebroside sulfate metabolism in cultured metachromatic leukodystrophy fibroblasts. *Science (New York, N.Y.)*, 172 (989), S.1263-1265.
- Ramaswami, U. (2011) Update on role of agalsidase alfa in management of Fabry disease. *Drug Design, Development and Therapy*, 5, S.155-173.
- Rapola, J. (1994) Lysosomal storage diseases in adults. *Pathology, Research and Practice*, 190 (8), S.759-766.
- Reddy, A., Caler, E.V. & Andrews, N.W. (2001) Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell*, 106 (2), S.157-169.
- Reitman, M.L. & Kornfeld, S. (1981) UDP-N-acetylglucosamine:glycoprotein N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. Proposed enzyme for the phosphorylation of the high mannose oligosaccharide units of lysosomal enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 256 (9), S.4275-4281.
- Richards, S.M., Olson, T.A. & McPherson, J.M. (1993) Antibody response in patients with Gaucher disease after repeated infusion with macrophage-targeted glucocerebrosidase. *Blood*, 82 (5), S.1402-1409.
- Robinson, A.J., Crawley, A.C., Auclair, D., Weston, P.F., Hirte, C., Hemsley, K.M. & Hopwood, J.J. (2008) Behavioural characterisation of the alpha-mannosidosis guinea pig. *Behavioural Brain Research*, 186 (2), S.176-184.
- Roces, D.P., Lüllmann-Rauch, R., Peng, J., Balducci, C., Andersson, C., Tollersrud, O., Fogh, J., Orlacchio, A., Beccari, T., Saftig, P. & von Figura, K. (2004) Efficacy of enzyme replacement therapy in alpha-mannosidosis mice: a preclinical animal study. *Human Molecular Genetics*, 13 (18), S.1979-1988.
- Roces, 2005, Efficacy of enzyme replacement therapy in α -mannosidosis Knock-out mice, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen
- Rosenberg, M., Kingma, W., Fitzpatrick, M.A. & Richards, S.M. (1999) Immunosurveillance of alglucerase enzyme therapy for Gaucher patients: induction of humoral tolerance in seroconverted patients after repeat administration. *Blood*, 93 (6), S.2081-2088.

- Saftig, P. & Klumperman, J. (2009) Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10 (9), S.623-635.
- Sands, M.S. & Haskins, M.E. (2008) CNS-directed gene therapy for lysosomal storage diseases. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992). Supplement*, 97 (457), S.22-27.
- Schiffmann, R., Kopp, J.B., Austin, H.A., 3rd, Sabnis, S., Moore, D.F., Weibel, T., Balow, J.E. & Brady, R.O. (2001) Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 285 (21), S.2743-2749.
- Simpson, I.A., Carruthers, A. & Vannucci, S.J. (2007) Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27 (11), S.1766-1791.
- Stinchi, S., Lüllmann-Rauch, R., Hartmann, D., Coenen, R., Beccari, T., Orlacchio, A., von Figura, K. & Saftig, P. (1999) Targeted disruption of the lysosomal alpha-mannosidase gene results in mice resembling a mild form of human alpha-mannosidosis. *Human Molecular Genetics*, 8 (8), S.1365-1372.
- Sugie, K., Koori, T., Yamamoto, A., Ogawa, M., Hirano, M., Inoue, K., Nonaka, I. & Nishino, I. (2003) Characterization of Danon disease in a male patient and his affected mother. *Neuromuscular Disorders: NMD*, 13 (9), S.708-711.
- Sun, H. & Wolfe, J.H. (2001) Recent progress in lysosomal alpha-mannosidase and its deficiency. *Experimental & Molecular Medicine*, 33 (1), S.1-7.
- Tranchant, C., Reis, J., Dietemann, J.L., Lannes, B., Maire, I. & Warter, J.M. (1991) [Mannosidosis type II]. *Revue Neurologique*, 147 (5), S.364-367.
- Urayama, A., Grubb, J.H., Sly, W.S. & Banks, W.A. (2004) Developmentally regulated mannose 6-phosphate receptor-mediated transport of a lysosomal enzyme across the blood-brain barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (34), S.12658-12663.
- Urayama, A., Grubb, J.H., Sly, W.S. & Banks, W.A. (2008) Mannose 6-phosphate receptor-mediated transport of sulfamidase across the blood-brain barrier in the newborn mouse. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 16 (7), S.1261-1266.
- Varki, A. & Kornfeld, S (1981) Purification and characterization of rat liver alpha-N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase. *The Journal of Biological Chemistry*, 256 (19), S.9937-9943.
- Vellodi, A. (2005) Lysosomal storage disorders. *British Journal of Haematology*, 128 (4), S.413-431.

- Vite, C.H., McGowan, J.C., Braund, K.G., Drobatz, K.J., Glickson, J.D., Wolfe, J.H. & Haskins, M.E. (2001) Histopathology, electrodiagnostic testing, and magnetic resonance imaging show significant peripheral and central nervous system myelin abnormalities in the cat model of alpha-mannosidosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60 (8), S.817-828.
- Vogler, C., Levy, B., Grubb, J.H., Galvin, N., Tan, Y., Kakkis, E., Pavloff, N. & Sly, W.S. (2005) Overcoming the blood-brain barrier with high-dose enzyme replacement therapy in murine mucopolysaccharidosis VII. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (41), S.14777-14782.
- Waheed, A., Hasilik, A. & von Figura, K. (1981) Processing of the phosphorylated recognition marker in lysosomal enzymes. Characterization and partial purification of a microsomal alpha-N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase. *The Journal of Biological Chemistry*, 256 (11), S.5717-5721.
- Walkley, S.U., Thrall, M.A., Dobrenis, K., Huang, M., March, P.A., Siegel, D.A. & Wurzelmann, S. (1994) Bone marrow transplantation corrects the enzyme defect in neurons of the central nervous system in a lysosomal storage disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 (8), S.2970-2974.
- Wall, D.A., Grange, D.K., Goulding, P., Daines, M., Luisiri, A. & Kotagal, S. (1998) Bone marrow transplantation for the treatment of alpha-mannosidosis. *The Journal of Pediatrics*, 133 (2), S.282-285.
- Weinreb, N.J. (2008) Imiglucerase and its use for the treatment of Gaucher's disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 9 (11), S.1987-2000.
- Wilcox, W.R. (2004) Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *The Journal of Pediatrics*, 144 (5 Suppl), S.S3-14.
- Will, A., Cooper, A., Hatton, C., Sardharwalla, I.B., Evans, D.I. & Stevens, R.F. (1987) Bone marrow transplantation in the treatment of alpha-mannosidosis. *Archives of Disease in Childhood*, 62 (10), S.1044-1049.
- Winchester, B.G. (2001) Lysosomal membrane proteins. *European Journal of Paediatric Neurology: EJPN: Official Journal of the European Paediatric Neurology Society*, 5 Suppl A, S.11-19.
- Winkel, L.P.F., Van den Hout, J.M.P., Kamphoven, J.H.J., Disseldorp, J.A.M., Remmerswaal, M., Arts, W.F.M., Loonen, M.C.B., Vulto, A.G., Van Doorn, P.A., De Jong, G., Hop, W., Smit, G.P.A., Shapira, S.K., Boer, M.A., van Diggelen, O.P., Reuser, A.J.J. & Van der Ploeg, A.T. (2004) Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe's disease: a three-year follow-up. *Annals of Neurology*, 55 (4), S.495-502.
- Wraith, J E (2002) Lysosomal disorders. *Seminars in Neonatology: SN*, 7 (1), S.75-83.

- Wraith, J.E., Clarke, L.A., Beck, M., Kolodny, E.H., Pastores, G.M., Muenzer, J., Rapoport, D.M., Berger, K.I., Swiedler, S.J., Kakkis, E.D., Braakman, T., Chadbourne, E., Walton-Bowen, K. & Cox, G.F. (2004) Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase). *The Journal of Pediatrics*, 144 (5), S.581-588.
- Wraith, J.E., Scarpa, M., Beck, M., Bodamer, O.A., De Meirleir, L., Guffon, N., Meldgaard Lund, A., Malm, G., Van der Ploeg, A.T. & Zeman, J. (2008) Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *European Journal of Pediatrics*, 167 (3), S.267-277.
- Wraith, J.E., Vecchio, D., Jacklin, E., Abel, L., Chadha-Boreham, H., Luzy, C., Giorgino, R. & Patterson, M.C. (2010) Miglustat in adult and juvenile patients with Niemann-Pick disease type C: long-term data from a clinical trial. *Molecular Genetics and Metabolism*, 99 (4), S.351-357.
- Zlokovic, B.V. (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57 (2), S.178-201.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

A. dest	destilliertes Wasser
AF	Alexa Fluor
AK	Antikörper
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BHK	Babyhamsterniere
BSA	Bovines Serumalbumin
CAU	Christian-Albrechts-Universität
CHO	Chinese Hamster Ovar (-Zellen)
CLN	Ceroidlipofuscinose neuronal
° C	Grad Celsius
DABCO	Diazabicyclooctan
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindol-dihydrochlorid
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
EA	Enzymassay
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERT	Enzyme replacement therapy, Enzym-Substitutions-Therapie
FCS	Fetal Calf Serum, fötales Kälberserum
GAGs	Glykosaminoglykane
GFAP	gliales fibrilläres saures (ac) Protein
ggf.	gegebenen falls
GM	Monosialo-tetrahexosyl-gangliosid
GUS	β-Glucuronidase
GSA	Griffonia simplicifolia agglutinin
H	Wasserstoff
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horse-Radish-Peroxidase, Meerrettichperoxidase
IF	Immunfluoreszenz
IGF2(R)	Insulin-like-growth-factor 2 (Rezeptor)

Ig	Immunglobilin
IH	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KO	knock-out
KO*	mit PBS scheinbehandelte knock-out
LAMP	Lysosomal assoziiertes Membranprotein
LIMP	Lysosomal integriertes Membranprotein
Lj.	Lebensjahr
LSD	Lysosomal storage disease
M.	Morbus
M	Molar
MBP	Myelin basisches Protein
MDR	multi-drug-resistance
MEF	murine embryonale Fibroblasten
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mM	Millimolar
MPR	Mannose-6-Phosphatrezeptor
MPR46	46 kDa Mannose-6-Phosphatrezeptor
MPR300	300kDa Mannose-6-Phosphatrezeptor
MPS	Mukopolysaccharidose
mU	Milliunit (Einheit der enzymatischen Aktivität)
M6P	Mannose-6-Phosphat (-Rest)
N	Asparagin
NaCl	Natrium-Chlorid
NCS	Neugeborenes Kälberserum
NGS	normal goat serum, normales Ziegen Serum
NPC	Niemann-Pick Typ C (Protein)
nm	Nanometer

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	Phosphatpuffer
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pcDNA	prozessierte complementäre DNA
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonen Konzentration
PNS	Peripheres Zervensystem
PS	100U/ml Penicillin + 0,1mg/ml Streptomycin
rpm	Umdrehungen pro Minute
rhLAMAN	rekombinante humane lysosomale α - Mannosidase
RT	Raum-/ Zimmertemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS (-T)	trisgepufferte Kochsalzlösung (+ 0,1 % Tween-20)
Temed	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
tg	transgen
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
U	Unit (Einheit der enzymatischen Aktivität)
V	Volt
WB	Westernblot
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

7.2. Verwendete Chemikalien

Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
ABTS	KPL, Gaithersburg, USA
APS	Roth, Karlsruhe
BSA	Sigma Aldrich, Steinheim
Butanol	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Complete Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim
DABCO	Sigma Aldrich, Steinheim
DAPI	Sigma Aldrich, Steinheim

DMEM High Glucose	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol (99,8%)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (100%)	Merck, Darmstadt
Exchange resin	Biorad, Hercules, USA
FCS	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Fluoromount	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycin	Roth, Karlsruhe
HPLC-Methanol	Merck, Darmstadt
HPLC-Wasser	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Ketamin (10%)	HFW, Bremer Pharma GmbH, Warburg
Methanol	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Mowiol	Calbiochem, Bad Soden
Natriumazid	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Nitromethan	Merck, Darmstadt
N-Propanol	Merck, Darmstadt
Ornicol	Sigma Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pen/Strep 100x PAA	Laboratories, Linz, Österreich
Ponceau S-Lösung	Sigma Aldrich, Steinheim
Proteinmarker	Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus, Fermentas, St. Leon-Rot
Rompun (2%)	Bayer Vial GmbH, Leverkusen
Salzsäure 37%ig	Roth, Karlsruhe
Saponin rein	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
Sucrose D (+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
Temed 99% für SDS-PAGE	Roth, Karlsruhe

Thioschwefelsäure (20%)	Merck, Darmstadt
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe; Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA 1x	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Tween-20	Sigma Aldrich, Steinheim
Ziegenserum (NGS)	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg

7.3. Verwendete Geräte

Analysenwaage	Kern & Sohn, Dürrewangen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Chemoluminiszenzkamera	LAS-1000, Fujifilm, Carrollton, USA
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M, Zeiss, Göttingen
Homogenisator	Precellys PeqLab, Erlangen
Horizontalschüttler	RM 5 Assistent, Sondheim
Inkubatoren	Heraeus, Hanau SalvisLab, Renggli AG, Rotkreuz, Schweiz
Mikropipetten	Gilson, Middleton, USA Eppendorf, Hamburg
96-well-Mikrotiterplattenleser	Sunrise, Tecan, Crailsheim
Mikrotom	Mryo-Mikrotom, Leica SM2000R, Leica, Wetzlar Leica EM UC6, Leica, Wetzlar
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Assistent, Sondheim
Parafilm	M Aclan Packaging, Neenah, WI, USA
pH-Meter	Krick, Langelselbold
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
SDS-PAGE Kammer	Mini-Protean 3-Elektrophoresis-System BioRad, Hercules, USA
Spannungsquelle	PowerPac 200/300, BioRad, München
Tank-Blot-Apparatur	BioRad, Hercules, USA
Thermoblock	Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	5415C Eppendorf, Hamburg

TLC-Platten	Silica Gel (F254) high performance, Merck, Darmstadt
Ultraschallstab	Micro Ultrasonic Cell Disrupter, Kimble/Kontes, Vineland, USA High Intensity Ultrasonic Processor (50-Watt Modell), Walter F. C., Ebel, Hamburg
Waage	Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Biofuge fresco, Heraeus, Hanau Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg CS-6KR Zentrifuge, Beckman, Fullerton, CA, USA (GH3.8-Rotor) Optima LE-80K-Ultrazentrifuge, Beckman Fullerton, USA (SW41 Ti- und 70.1 Ti-Rotor) Optima TLX-Ultrazentrifuge, Beckman Fullerton, USA (TLA 55-Rotor) Universal 32, Typ 1605, Hettich, Tuttlingen Speed-Vac (Kühlaggregat von Christ (Alpha 1-4), Rotor von Bachhofer Vacuum Concentrator)

7.4. Verwendete Materialien

Deckgläschen	Assistent, Sondheim
Einmalspritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalkanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
Enzyme (in 0,2 M Citratpuffer)	10 mM p-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid, 10 mM p-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D glucosaminide, 10 mM p-Nitrophenyl- β -D-glucuronid von Sigma Aldrich, Steinheim
Kunststoffverbrauchsmaterial	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrocellulosemembran	Whatman GmbH, Dassel
Objektträger	Assistent, Sondheim
Parafilm	M American National Can, Greenwich, England
Pasteurpipetten	Assistent, Sondheim

Polystyrenröhrchen (5ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Western Blot Filterpapiere	Schleicher & Schuell, Dassel
Western-Blot-Detektionskit	ECL advanced WB Detection System bzw. ECL plus WB Detection System, Amersham, Little Chalfont, England
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen	Kontron, Zürich, CH

7.5. Verwendete Rezepte

Citratpuffer pH 4,6	0,2 M Natriumcitrat 0,04 % NaN ₃ 0,2 % BSA
Lysispuffer	10 mM Tris/HCl pH 7,4 150 mM NaCl 1 x Complete 1x PEFA (Proteininhibitor) 5 mM EDTA 0,5 % Triton
Lysispuffer für Zellen	PBS 0,5 % Triton 1 x PEFA 1 x Complete
Mowiol/DABCO/DAPI	1 ml Mowiol Lösung 0,1 ml DABCO-Stammlösung +1 µl 1 mg/ml DAPI in PBS
10 x PBS-Stammlösung	80 g (1,37M) NaCl 2 g (2,7mM) KCl 14,4 g (10mM) Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei) 82,4 g (1,8mM) KH ₂ PO ₄ (wasserfrei) +1000 ml A. dest, pH 7,4
0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4	77,4 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ 22,6 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ +1000 ml A. dest

Sammelgel (4,5 % Acrylamid)	2,5 ml Sammelgelpuffer 1,6 ml 30 %-iges Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid 5,8 ml A. dest 60 µl 10 %-iges APS 30 µl 100 %-iges Temed
Sammelgelpuffer	30,28 g Tris/HCL 2 g SDS +500 ml A. dest, pH 6,8
10 x SDS-Elektrophoresepuffer	250 mM Tris 2 M Glycin 1% SDS +1000 ml A. dest ph NICHT einstellen
Sucroslösung	0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 30 % Sucrose
10 x Tank-Blot-Puffer	250 mM Tris 2 M Glycin in 500 ml A. dest, pH 8,3
Tank-Blot-Puffer	200 ml 10x Puffer 400 ml Methanol +1400 ml A. dest
10x TBS-Stammlösung	150 g Tris 10 g KCl 400 g NaCl +5000 ml A. dest, pH 7,5
TBS-T	1000 µl Tween-20 auf 1000 ml 1x TBS
Trenngel (12,5 % Acrylamid)	2,5 ml Trenngelpuffer 4,1 ml 30 %-iges Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid 3,3 ml A. dest 60 µl 10 %-iges APS 30 µl 100 %-iges Temed
Trenngelpuffer	90,85 g Tris/HCl 2 g SDS +500 ml A. dest, pH 8,8

7.6. Tierschutzgenehmigung

Ministerium für Landwirtschaft,
Umwelt und ländliche Räume
des Landes Schleswig-Holstein

Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |
Postfach 50 09 | 24062 Kiel

Herrn
Prof. Dr. Paul Saftig
Biochemisches Institut
Christian-Albrechts-Universität
Olshausenstr. 40
24098 Kiel

Ihr Antrag vom: 08.06.2006
Mein Zeichen: V 312-72241.121-3 (60-5/06)

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:
Herrn Prof. Dr. Ingo C. Reetz
Tierschutzbeauftragter der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Olshausenstraße 40
24098 Kiel

20. Juli 2006

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrter Herr Prof. Saftig,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom
18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206) erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des
Versuchsvorhabens

Überprüfung der therapeutischen Wirksamkeit von
Enzymsubstitution in α -Mannosidose Mäusen

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 125 Mäuse verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Juli 2008 befristet.
Sie kann auf formlosen, hinreichend begründeten Antrag um ein Jahr verlängert
werden, sofern keine wesentlichen Änderungen der Genehmigungsvoraussetzungen
eingetreten sind.
3. Leiter des Versuchsvorhabens:
Herr Prof. Dr. Paul Saftig

4. Seine Stellvertreterin:
Frau Dr. Judith Blanz
5. Wechselt der Leiter des Versuchsvorhabens oder seine Stellvertreterin, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.
6. Verantwortlicher Tierarzt nach § 9 Abs. 2 Nr. 8 Tierschutzgesetz:
Herr Prof. Dr. Ingo C. Reetz
7. Weitere Nebenbestimmungen:
Die Genehmigung beschränkt sich zunächst auf die Versuchsabschnitte 1 und 2. Danach ist ein Zwischenbericht vorzulegen. Darin ist auch die Frage zu prüfen, ob die geplanten Verhaltenstests bereits im Rahmen der vorhergehenden Versuche (ohne einen zusätzlichen Bedarf an Tieren) abgewickelt werden können.

Die Bestimmungen der §§ 8, 9 und 9a Tierschutzgesetz sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVBl. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten.

Ich weise insbesondere darauf hin, dass Tierversuche nur durch den in § 9 Abs. 1 Tierschutzgesetz genannten Personenkreis durchgeführt werden dürfen.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Zustellung schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle Klage beim Verwaltungsgericht Schleswig-Holstein in 24837 Schleswig, Brockdorff-Rantzau-Straße 13, erhoben werden.

Mit freundlichen Grüßen



Dr. Irmer

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Paul Saftig für die Betreuung und die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Judith Blanz für die gute Anleitung und Betreuung der Arbeit über so viele Jahre.

Bei Inez Götting bedanke ich mich recht herzlich für die bereitwillige Einarbeitung in diverse biochemische Verfahren sowie die sehr gute, kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Der Crew der AG Saftig zu Dissertationszeiten, allen voran Kathi Stiebeling, Johann Groth und Christina Zachos sage ich ein großes Dankeschön für eine interessante und angenehme Laborzeit neben dem Studium.

Ich danke Frau Prof. Dr. Lüllmann-Rauch vom Anatomischen Institut der Christian-Albrecht Universität zu Kiel (CAU), Herrn Prof. Dr. Rautenberg vom Institute für Infektionsmedizin der CAU und des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel (UKSH) für das Interesse und die freundliche Unterstützung in bezug auf Teilbereiche dieser Arbeit.

Dr. Hartz gilt mein Dank für die Unterstützung während des Verfassens dieser Arbeit.

Ein ganz besonders großer Dank gilt meiner Familie, allen voran meinem Mann Daniel und meinen Eltern. Ohne Eure Unterstützung wäre es mir nicht möglich gewesen diese Arbeit durchzuführen und vor allem abzuschließen. Vielen herzlichen Dank für die kontinuierliche Motivation und Förderung, die bisweilen intensive zeitliche Unterstützung, sowie Euer stetiges Vertrauen in mich und diese Arbeit.

Thomas und Johannes danke ich für neue Perspektiven.

9. Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

- Blanz, J., Stroobants, S., Lüllmann-Rauch, R., Morelle, W., Lüdemann, M., D'Hooge, R., Reuterwall, H., Michalski, J.C., Fogh, J., Andersson, C. & Saftig, P. (2008) Reversal of peripheral and central neural storage and ataxia after recombinant enzyme replacement therapy in alpha-mannosidosis mice. *Human Molecular Genetics*, 17 (22), S.3437-3445.
- Damme, M., Stroobants, S., Walkley, S.U., Lüllmann-Rauch, R., D'Hooge, R., Fogh, J., Saftig, P., Lübke, T. & Blanz, J. (2011) Cerebellar alterations and gait defects as therapeutic outcome measures for enzyme replacement therapy in α -mannosidosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 70 (1), S.83-94.

10. Lebenslauf

Name: Meike Lüdemann
Geburtsdatum: 03.10.1981
Geburtsort: Kaltenkirchen, Deutschland
Staatsbürgerschaft: deutsch
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

SCHULAUSBILDUNG

1988-1992 Grund- und Hauptschule in Bordesholm
1992-2001 Alexander-von-Humboldt-Gymnasium in Neumünster

AUSBILDUNG/ BERUFSERFAHRUNG

02/2002-02/2005 Ausbildung zur Gesundheits- und Krankenpflegerin im
Klinikum Nord des LBK Hamburg
04/2005-10/2005 Anstellung als Gesundheits- und Krankenpflegerin im
Friedrich-Ebert-Krankenhaus in Neumünster
05/2005-10/2005 Weiterbildung zur Pflegediagnostikerin im Prozess-
management berufsbegleitend am IfPPs in Cloppenburg

STUDIUM

08/2005-11/2012 Humanmedizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel
08/2007-06/2013 Dissertation am Institut für Biochemie der Medizinische
Fakultät der CAU zu Kiel bei Prof. Dr. rer. nat. Paul Saftig und
Dr. rer. nat. Judith Blanz im Rahmen des HUE-MAN Projekts
03/2008 1. Staatsexamen
2008-2011 Famulaturen in den Fachbereichen Onkologie/ Innere
Medizin, Anästhesie, Gynäkologie und Geburtshilfe, Pädiatrie
(Villa Metabolica der Uniklinik Mainz: Arbeitsgemeinschaft
Lysosomale Speichererkrankungen) und Allgemeinmedizin
08/2011-07/2012 Praktisches Jahr (Wahlfach: Radiologie)
10 u. 11/2012 2. Staatsexamen